

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Adéla Michalíková

CHARAKTERIZACE A HODNOCENÍ STABILITY OLEJŮ Z PLODŮ RAKYTNÍKU

Characterization and evaluation of stability of oils from sea
buckthorn berries

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18. 5. 2017

Poděkování

Ráda bych touto formou poděkovala panu prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnoval. Moje díky patří také rodině a přátelům, kteří při mně stáli po celou dobu studia.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá charakterizací rakytníkového oleje, který je v současné době považován za velice užitečný potravinový doplněk. Po shrnutí literárních údajů o rakytníkovém oleji a jeho biologických účincích se práce v experimentální části věnuje srovnání tří komerčně dostupných preparátů z rakytníkového oleje. Základní charakterizace jednotlivých olejů byla provedena titrační metodou pomocí tukových čísel, tedy peroxidového čísla, jodového čísla, čísla zmýdelnění a čísla kyselosti. K další charakterizaci olejů bylo použito spektrofotometrických metod. Výsledky ukazují výrazné rozdíly mezi jednotlivými vzorky olejů. V průběhu skladování se mezi sebou jednotlivé vzorky olejů lišily hodnotami peroxidových čísel a stabilitou. V tomto ohledu měl rakytníkový olej pocházející od firmy Relikt – Art Engel výrazně nižší hodnoty peroxidového čísla (2,95 mekv/kg) ve srovnání s oleji ze společností Elith Phito a Virde, u kterých byly naměřeny hodnoty peroxidového čísla 12,68 a 8,97 mekv/kg. Hodnota peroxidového čísla značky Relikt – Art Engel se v průběhu skladování téměř neměnila. Podobné rozdíly byly zjištěny také při zkoumání kolorimetrických parametrů, kdy tento olej vykazoval mnohem nižší optickou hustotu než ostatní analyzované oleje. Tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdílnou technologií výroby rakytníkových olejů, ale také se může jednat o nařazení jinými rostlinnými oleji.

Klíčová slova: Rakytník řešetlákový, rakytníkový olej, mastné kyseliny, peroxidové číslo, kolorimetrie

Abstract

This diploma thesis deals with characterization of sea buckthorn oil. The sea buckthorn oil is frequently used as a food supplement and in dermatology. The first part summarizes the literature on sea buckthorn oil and its biological effects. In the experimental part, the thesis deals with the comparison of three commercially available preparates of sea buckthorn oils. We employed the basic characteristics of these oils, including the determination of peroxide value, iodine value, saponification value and acid value using titration methods. Spectroscopic measurements were used to further characterize the oils. The compared sea buckthorn oil samples differed strongly in the peroxide value and in the stability during storage. In this respect, the oil from Relikt – Art Engel company had significantly lower value (2,95 mekv/kg) compared to other two oil samples studied from Elith Phito and Virde companies with peroxide values 12,68 and 8,97 mekv/kg. This value was also much less prone to increase during storage. A similar difference was also found in spectral and colorimetric characteristics of the oil samples, where this oil displayed much less optical density than the other two samples. This might be a result of different technology used for production of oils, or it may reflect some adulteration, e.g., by dilution with other vegetable oil.

Keywords: Sea buckthorn, sea buckthorn oil, fatty acids, peroxide value, colorimetry

Obsah

Seznam použitých zkratek	- 9 -
1 ÚVOD.....	- 10 -
2 PŘEHLED LITERATURY	- 11 -
2.1 Rakytník řešetlákový	- 11 -
2.1.1 Botanický popis	- 11 -
2.1.2 Přenos pylu	- 12 -
2.1.3 Rozmnožování a výsadba rakytníku.....	- 13 -
2.1.4 Sklizeň	- 14 -
2.2 Aktivní látky obsažené v rakytníku řešetlákovém	- 15 -
2.2.1 Flavonoidy.....	- 15 -
2.2.2 Vitamín C	- 16 -
2.2.3 Sacharidy a organické kyseliny	- 17 -
2.2.4 Karotenoidy	- 17 -
2.2.5 Tokoferoly a tokotrienoly	- 18 -
2.3 Účinky a využití biologicky aktivních látek	- 18 -
2.3.1 Ochrana a regenerace kůže a sliznic.....	- 18 -
2.3.2 Antimikrobní účinky	- 19 -
2.3.3 Trávicí soustava.....	- 19 -
2.3.4 Imunitní systém	- 19 -
2.3.5 Nádorová onemocnění	- 19 -
2.3.6 Kardiovaskulární systém	- 20 -
2.3.7 Hepatoprotektivní účinky	- 20 -
2.4 Rakytníkový olej	- 20 -
2.4.1 Složení rakytníkového oleje	- 21 -
2.4.2 Stabilita a skladování olejů.....	- 22 -

2.4.3	Variabilita ve složení olejů	- 22 -
2.5	Metody charakterizace tuků a olejů	- 23 -
2.5.1	Peroxidové číslo	- 24 -
2.5.2	Jodové číslo	- 24 -
2.5.3	Číslo zmýdelnění	- 25 -
2.5.4	Číslo kyselosti	- 25 -
2.5.5	Esterové číslo.....	- 25 -
2.5.6	Hydroxylové číslo	- 25 -
2.5.7	Měření barevnosti, kolorimetrické parametry	- 26 -
3	CÍL PRÁCE.....	- 28 -
4	MATERIÁL A METODIKA	- 28 -
4.1	Použité vzorky	- 28 -
4.2	Použité chemikálie	- 29 -
4.3	Použitá zařízení a software	- 29 -
4.4	Použité metody a příprava roztoků pro jednotlivá stanovení.....	- 30 -
4.4.1	Stanovení peroxidového čísla.....	- 30 -
4.4.2	Stanovení jodového čísla podle Hanuše	- 31 -
4.4.3	Stanovení čísla zmýdelnění	- 32 -
4.4.4	Stanovení čísla kyselosti.....	- 34 -
4.5	Měření barevnosti	- 35 -
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	- 36 -
5.1	Tuková čísla.....	- 36 -
5.1.1	Peroxidové číslo	- 36 -
5.1.2	Jodové číslo	- 39 -
5.1.3	Číslo zmýdelnění	- 40 -
5.1.4	Číslo kyselosti	- 41 -
5.1.5	Esterové číslo.....	- 42 -

5.2	Měření barevnosti, kolorimetrické parametry.....	- 42 -
5.3	Celkové shrnutí jednotlivých vzorků a kvalitativní závěry	- 46 -
6	ZÁVĚR.....	- 47 -
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 48 -

Seznam použitých zkratek

CIE	Mezinárodní komise pro osvětlení
ČSN	česká technická norma
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
MUFA	monoenová nenasycená mastná kyselina
PUFA	polyenová nenasycená mastná kyselina
UV	ultrafialové

1 ÚVOD

Rakytník řešetlákový (*Hippophae rhamnoides* L.) je dvoudomý, větrosnubný a mrazuvzdorný keř z čeledi hlošínovitých (*Elaeagnaceae*). Tento keř je rozšířen a často i pěstován na asijském a evropském kontinentě. Vyskytuje se převážně ve vyšších nadmořských výškách a nevadí mu výkyvy teplot. Rakytník je často využíván jako zdroj biologicky aktivních látek, které se nacházejí prakticky ve všech částech rostliny, zejména v plodech a listech. Rakytník řešetlákový a jeho léčebné účinky na lidské zdraví, díky kterým je tento keř často vyhledáván, jsou přehledně zpracovány v práci Jana Blechy ^[1]. Rakytníku se věnuje i má bakalářská práce ^[2], na kterou touto prací navazuji.

Charakteristickou komponentou veškerých olejů jsou mastné kyseliny. Rakytníkový olej obsahuje významné množství nenasycených mastných kyselin, jako jsou kyseliny linolová a α -linolenová, které tvoří esenciální složku potravy člověka. Rakytníkový olej obsahuje významné množství obou těchto kyselin. U olejů dochází poměrně snadno k oxidaci a tím pádem k ztrátě nutriční hodnoty oleje. Proto by měl být zároveň s příjmem polyenových mastných kyselin, zvýšen příjem antioxidantů. Ty se v rakytníkovém oleji nacházejí ve značném množství, ať už se jedná o tokoferoly, flavonoidy, či karotenoidy. Obsah jednotlivých složek a výsledné složení olejů ovlivňují různé faktory, jakými jsou například stáří rostlin, kultivační a růstové podmínky nebo způsob zpracování. Český trh nabízí širokou škálu produktů obsahující rakytníkový olej v podobě kapek, kapslí, nebo jako součást různých kosmetických přípravků. Kromě uplatnění v medicíně, nachází rakytník využití i jako rostlina vhodná pro rekultivaci zničených půd ^[3].

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Rakytník řešetlákový

Rodový název *Hippophae* je odvozen z latiny. Základem názvu jsou dvě slova: *hippos* – kůň a *pháo* – zářivý. Tato rostlina byla takto údajně pojmenována proto, že staří Řekové v minulosti používali rakytník jako krmivo pro svá domácí zvířata, zejména koně, aby měla lesklejší srst ^[4].

2.1.1 Botanický popis

Čeleď hlošinovitých (*Elaeagnaceae*) zahrnuje kromě rodu *Hippophae* – rakytník ještě další dva rody, jimiž jsou *Shepherdia* – šeferdie a *Elaeagnus* – hlošina ^[5]. Rod *Shepherdia* roste zejména v Severní Americe. Další dva zástupci této čeledi (*Hippophae* a *Elaeagnus*) se nachází na území Evropy a Asie. Pro všechny rody z této čeledi jsou charakteristické stříbřitě zbarvené listy a plod, kterým je oříšek obalený zdužnatělou češulí (nepravá peckovice) ^[6].

Rod *Hippophae* je možné rozdělit na čtyři základní druhy ^[7], které se mezi sebou liší místem výskytu, rozdílnou výškou rostlin, velikostí plodů, či bioaktivními látkami v nich obsažených:

***H. rhamnoides* – Rakytník řešetlákový**

H. salicifolia – Rakytník vrboolistý

H. tibetana – Rakytník tibetský

H. neurocarpa – Rakytník žebrovitý

Novější literatura ^[8] rozlišuje navíc druhy *H. goniocarpa*, *H. gyantsensis* a *H. litangensis*.



Obrázek 1 Větev rakytníku řešetlákového se zralými plody, převzato z: ^[9]

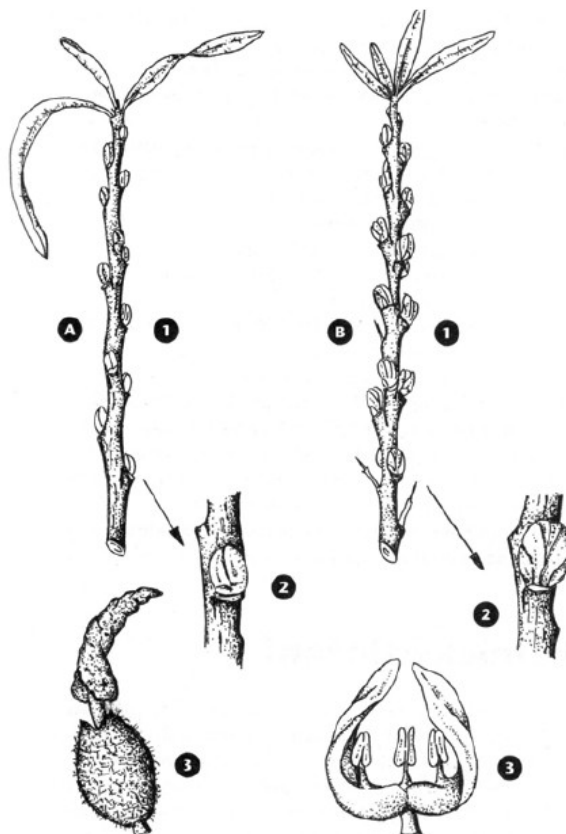
Nejrozšířenějším druhem je rakytník řešetlákový zejména díky své přizpůsobivosti, mrazuvzdornosti a kvalitě plodů. Jedná se o keř nebo strom, který obvykle dorůstá výšky 3 - 4 m ^[4]. Kopinaté listy rakytníku mají střídavé postavení na stonku. Svrchní strana listů rakytníku řešetlákového je zbarvena do tmavozelena, zatímco spodní stranu listů pokrývají krátké chlupy, které dávají rubu stříbřitě šedou barvu. Pupeny samčích rostlin bývají 2 – 3 krát větší než samičí. Samčí a samičí pupeny lze dobře rozlišit v zimním období čtvrtého roku růstu rostliny, to znamená v době její plodnosti. Do té doby se od sebe samčí a samičí rostliny příliš neliší ^[6]. Dalším rozdílem mezi samičími a samčími rostlinami jsou květy. U samičích rostlin se vyznačují žlutavým zabarvením a mají nálevkovitý kalich se skrytým pestíkem. Samčí květy jsou zelenavě stříbrné a vyrůstají v hroznech. Plodem rakytníku je kulovitá, elipsoidní nebo vejcovitá nepravá peckovice, (viz. obrázek 1). Barva plodů se liší v závislosti na podnebí nebo typu odrůdy. Většina odrůd má různé odstíny oranžové barvy, mohou však být i žluté až červené, v závislosti na obsahu karotenoidů ^[4]. Velikost plodů se pohybuje od 0,5 – 1 cm. Semena jsou lesklá a mají šedohnědý až hnědý odstín ^[10]. Větve rakytníku bývají často trnité a barva kůry závisí na stáří rostliny, má od šedé až po tmavě hnědou barvu ^[4].

Rakytník kvete v dubnu, kdy se průměrné denní teploty pohybují v rozmezí od 7 do 12 °C. Na obsah bioaktivních látek má značný vliv okolní teplota. Bylo zjištěno, že vyšší teplota okolí způsobuje akumulaci karotenoidů, zatímco u rostlin vystavených chladnějšímu a deštivému prostředí byl pozorován vyšší obsah vitamínu C ^[11]. Kořenový systém rakytníku je spíše povrchový, hlavní kořen rakytníku sahá do hloubky 40 – 50 cm a dále se rozvětňuje pomocí bočních kořenů. U vzrostlých a starších keřů pronikají kořeny až za obvod koruny, kde z nich vyrůstají kořenové výběžky, které také mohou sloužit k rozmnožování. Na kořenech rakytníku se vytvářejí hlízkovité útvary obsahující takzvané nitrifikační bakterie, které mu umožňují fixovat vzdušný dusík. Díky těmto bakteriím rakytník v podstatě nepotřebuje hnojení dusíkatými hnojivy. Zatímco hostitelská rostlina poskytuje bakteriím asimiláty, bakterie zajišťují vzdušný kyslík ^[6, 12].

2.1.2 Přenos pylu

Jak již bylo uvedeno, rakytník je anemofilní (větrosnubná) rostlina. Přenos pylu ze samčích rostlin na bliznu samičích rostlin je zprostředkován převážně pomocí vzduchu. Hmyz se na opylování příliš nepodílí. Květy rakytníku pro něj nejsou dostatečně přitažlivé,

neboť neobsahují nektaria. Lepšímu přenosu pylu dopomáhá morfologická úprava květů. U samčích květů se semknutím květních šupin v jejich horní části vytváří štěrba, z které lze pyl lehce vyfouknout. Zároveň je touto modifikací pyl chráněn před rosou a nepříznivými podmínkami. Samičí květy naproti tomu mají bliznu vystouplou, což opylení usnadňuje (obrázek 2) ^[6].



Obrázek 2 Rozdíl mezi samičí (A) a samčí (B) rostlinou rakytníku
1 – výhony s pupeny, 2 – pupeny, 3 – květy, převzato z: ^[12]

Z jednoho květního pupenu se vyvine 2 – 14 plodů. Počet plodů, které se vyvinou závisí mimo jiné na vzdálenosti opylovače (samčí rostliny). Čím je opylovač blíže k samičím rostlinám, tím více plodů se urodí. ^[11].

2.1.3 Rozmnožování a výsadba rakytníku

Rozmnožování rakytníku je možné provést generativně, to znamená semeny, nebo vegetativně, což zahrnuje několik způsobů provedení (očkování, roubování, řízků aj.).

Generativní rozmnožování je jednoduchý a nejběžnější způsob. Nevýhodou je dvoudomost rakytníku a skutečnost, že pohlaví rostlin je možné rozeznat až od 3. – 4.

roku rostliny. Tento způsob rozmnožování se pro velkovýrobní výsadbu příliš nehodí kvůli vyššímu výskytu samčích rostlin (až 80 %) a tím i nižším výnosem plodů, jelikož plodí pouze samičí rostliny^[10].

Vegetativní rozmnožování na rozdíl od generativního umožňuje zachovat vlastnosti původní odrůdy rakytníku. Plody se u tohoto způsobu rozmnožování objeví o 1 – 2 roky dříve než u rostlin vzniklých ze semen. Při vegetativním rozmnožování je možné použít několika způsobů. Rostlinu můžeme množit především pomocí metod očkování, roubování povrchových částí, nebo již zmíněnými kořenovými výběžky. Dále se k množení mohou použít odříznuté části rostlin a to jeho bylinné (zelené), dřevité či kořenové řízky. Pro velkovýrobu se nejběžněji používají bylinné řízky, které zabezpečují vysokou úspěšnost rozmnožování^[6, 11, 12].

V přírodních podmínkách se rakytník vyskytuje na různorodých typech půd, hojněji však na půdách vyznačujících se dostatkem živin a bohatých na organické látky. Lépe se daří rostlinám na písčitých půdách s neutrálním pH (6,5 – 7,5). Stejně tak se mohou využívat různé typy půd i při kultivaci. Z ekonomických důvodů je velice důležitý poměr samčích a samičích rostlin při výsadbě. Vysoké výnosy byly pozorovány při vysazení jedné samčí rostliny na pět samičích^[11, 12].

2.1.4 Sklizeň

Zralost plodů určuje několik faktorů. Hlavním vodítkem pro zahájení sběru může být obsah cukru. Na počátku zrání se v plodech vyskytuje vyšší obsah vitamínu C a méně cukru a oleje. S postupným dozráváním se obsah cukru zvyšuje a s ním i obsah oleje v dužině. Většinou se plody rakytníku sklízí, když získají svoji správnou odrůdovou barvu. V této době mají pevnou slupku, která nepuká při sklizni^[6].

Sběr plodů je u rakytníku časově a technologicky nejnáročnější operací. Rakytníkové plody se vyznačují krátkou stopkou, díky níž pevně drží u větví. Rakytník má relativně malé plody. Zároveň jsou jeho větve pokryty pevnými a dlouhými trny, proto je sklizeň těchto plodů obtížná, zvláště ruční sklizeň. Proto se používá různých česacích pomůcek, které ovšem mnohdy poškozují plody, či samotný keř. Dále je používána metoda zmrazení odstřižnutých větví i s plody a následné oklepání. Nevýhodou tohoto postupu je, že při ostrhávání plodných větví snížíme výnos na příští rok. Další plody se objeví znovu až po dvou letech. Poměrně efektivní metodou je setřásání plodů z keřů za pomoci sklízecích kombajnů. Tento způsob se využívá hlavně pro průmyslovou sklizeň^[11, 13].

2.2 Aktivní látky obsažené v rakytníku řešetákovém

Starší poznatky o složení jednotlivých částí rakytníku jsou shrnuty v kompendiu chemické taxonomie ^[5]. Toto kompendium považuje za významné přítomnost fenolických látek, jejichž stanovením v rakytníkových plodech se věnují i publikace z posledních let ^[14, 15]. Kromě fenolických látek, obsahuje rakytník i mnoho dalších mimořádně cenných bioaktivních látek, které jsou obsažené ve všech částech rostliny rakytníku a mají řadu prokázaných léčebných účinků. K významným biologicky aktivním látkám patří zejména různé vitaminy, flavonoidy, karotenoidy, steroly, organické kyseliny, sacharidy či mastné kyseliny. Uvedené látky, jsou podrobněji popsány v práci J. Blechy ^[1] a byla jim věnována pozornost i v mé bakalářské práci ^[2]. V následujících podkapitolách jsou zmíněni nejdůležitější zástupci z řad bioaktivních látek.

Celkový přehled množství jednotlivých bioaktivních látek, které se vyskytují v rakytníkových plodech, je uveden v tabulce 1.

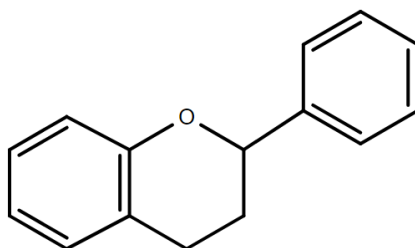
Tabulka 1 Množství obsahových látek v plodech rakytníku řešetlákového ^[16]

Obsahová látka	Množství v rakytníkových plodech
Flavonoidy	1100 – 2100 mg/kg
Vitamin C	300 – 25 000 mg/kg
Karotenoidy	30 – 150 mg/kg
Tokoferoly a tokotrienoly	10 – 150 mg/kg
Steroly	350 – 500 mg/kg

2.2.1 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří největší skupinu antioxidantů v přírodě. Jejich struktura se skládá ze dvou aromatických kruhů. Podle typu obsažených heterocyklů se dále dělí na šest podskupin. Základní strukturu všech flavonoidů tvoří heterocyklická kyslíkatá sloučenina flavan, jehož strukturní vzorec je uveden na obrázku 3. Flavonoidy patří mezi fenolické sloučeniny a vyskytují se především v ovoci, červeném víně, kávě, a čaji ^[17, 18]. Jsou to rostlinná barviva a nalezneme je ve všech rostlinných buňkách. Běžný denní příjem flavonoidů u člověka se pohybuje okolo 1 – 2 g. Jednou z nejužitečnějších vlastností

mnoha flavonoidů je jejich schopnost zachycovat volné radikály ^[19].

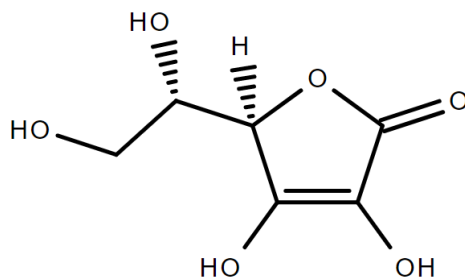


Obrázek 3 Strukturní vzorec flavanu ^[20]

Obsah flavonoidů je důležitým ukazatelem jakosti a léčebného potenciálu rakytníkových bobulí. Flavonoidům obsažených v rakytníkových bobulích nebo v produktech z rakytníku bývá připisována řada prospěšných účinků na lidské zdraví. Mezi hlavní flavonoidy, které byly zjištěny v rakytníku řešetlákovém, patří isorhamnetin, quercetin, myricetin a kaempferol a jejich glykosidické sloučeniny. Z těchto je nejvíce zastoupen isorhamnetin (350 – 660 mg/kg) ^[21]. Flavonoidy jsou obsaženy ve všech částech rakytníku – v plodech, květech, listech, kůře i kořenech v různém zastoupení ^[22].

2.2.2 Vitamín C

Rakytníkové plody se vyznačují vysokým obsahem vitamínu C, neboli kyseliny L - askorbové. Vitamín C se řadí mezi vitamíny rozpustné ve vodě a pro člověka je jeho příjem nezbytný, jelikož si ho jeho tělo neumí samo syntetizovat. V lidském organismu plní řadu důležitých funkcí. Je to významný antioxidant a stejně jako u flavonoidů i u něj byl prokázán příznivý efekt v prevenci proti ateroskleróze nebo nádorovým onemocněním. Denní doporučený příjem vitamínu C představuje množství okolo 80 mg ^[23]. Strukturní vzorec kyseliny askorbové je uveden na obrázku 4.



Obrázek 4 Vzorec kyseliny askorbové ^[20]

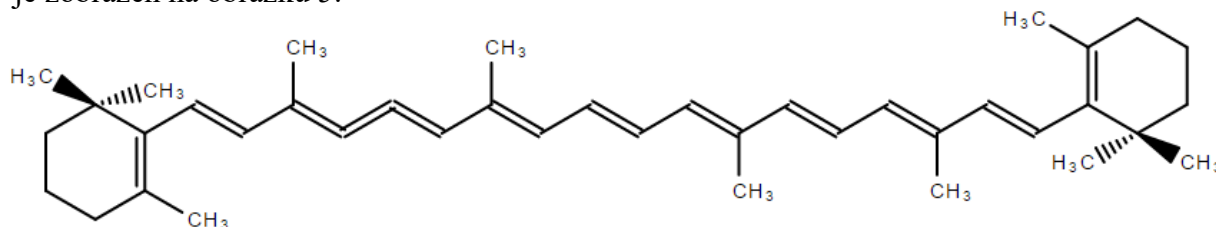
Rakytník řešetlákový obsahuje okolo 370 mg kyseliny askorbové na 100 g plodů^[21]. Jiné druhy rakytníku mohou obsahovat až 7x více kyseliny askorbové na 100 g plodů, čímž se rakytník řadí mezi vynikající zdroje tohoto vitamínu. Koncentrace vitamínu C v rakytníkových plodech kolísá v závislosti na geografickém umístění a okolních podmínkách, při kterých rostlina vyrůstá^[24].

2.2.3 Sacharidy a organické kyseliny

Sacharidy a kyseliny obsažené v rakytníkových plodech významně ovlivňují senzorické vlastnosti rakytníkových plodů. Množství těchto dvou složek hraje hlavní roli ve výsledné chuti rakytníkových plodů a z nich vyráběných produktů. Množství těchto látek se mění v průběhu zrání plodů. Z jednoduchých cukrů byl zjištěn nejvyšší podíl fruktosy (okolo 0,54 g/100 g) a glukosy (až 2,10 g/100 g)^[21]. Kromě cukrů, obsahuje dužina rakytníkových plodů rovněž množství cyklitolů, například manitol^[5]. Z organických kyselin jsou nejvíce zastoupeny kyselina jablečná a chinová^[25].

2.2.4 Karotenoidy

Karotenoidy jsou další antioxidační složkou, kterou rakytníkové plody obsahují. Struktura karotenoidů je tvořena dlouhým řetězcem s konjugovanými dvojnými vazbami. Prozatím bylo v přírodě identifikováno přes 600 druhů látek, řadící se mezi karotenoidy, ale pouze okolo 40 je obsaženo v běžné lidské stravě. Karotenoidy jsou důležitým prekurzorem vitamínu A. Většinu karotenoidů v lidském těle představují β -karoten, α -karoten, lykopen, lutein a kryptoxantin. Denní příjem okolo 5 – 7 mg je dostačující množství karotenoidů pro udržení hladiny v lidském organismu, která je potřebná k efektivnímu boji proti oxidačnímu stresu a na prevenci chronických chorob^[26]. Strukturní vzorec jednoho z hlavních karotenoidů - β -karotenu obsaženého v rakytníku je zobrazen na obrázku 5.

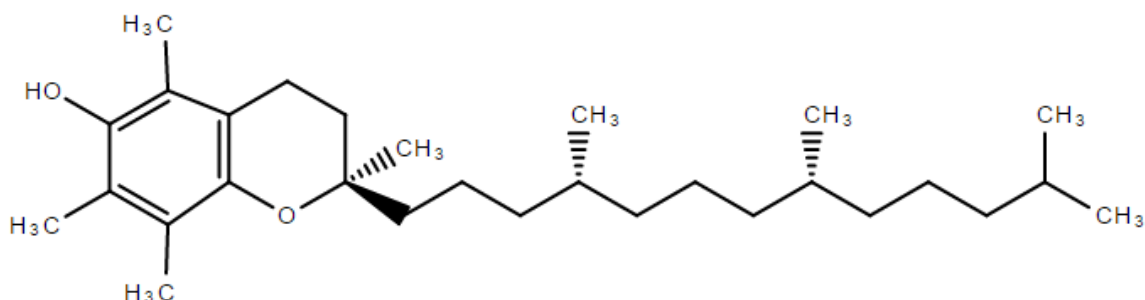


Obrázek 5 Strukturní vzorec β -karotenu^[20]

Mezi hlavní karotenoidy obsažené v rakytníku patří zeaxantin (30 – 150 mg/kg), β -karoten (3 – 50 mg) a β -kryptoxantin (5 – 19 mg/kg) ^[21]. Karotenoidy jsou rostlinné pigmenty a jsou zodpovědné za rozličné zbarvení plodů, nejen u rakytníku.

2.2.5 Tokoferoly a tokotrienoly

Tokoferoly a tokotrienoly shrnuje název vitamín E. Vitamín E se řadí mezi vitamíny rozpustné v tucích a je hlavním antioxidantem v buněčných membránách. Byl popsán synergický efekt mezi vitamíny E a C ^[27]. Strukturní vzorec α -tokoferolu, který je nejvíce zastoupen v rakytníku, je uveden na obrázku 6.



Obrázek 6 Vzorec α -tokoferolu ^[20]

Existuje několik isomerů tokoferolů i tokotrienolů, přičemž v rakytníkových plodech se nachází α , β , γ , δ – tokoferol a α , β , γ – tokotrienol. Dužina plodů rakytníku obsahuje až 80 % α – tokoferolu. Isomer α - tokoferol je s γ – tokoferolem nejčastěji zastoupen i v semenech rakytníku ^[27].

2.3 Účinky a využití biologicky aktivních látek

2.3.1 Ochrana a regenerace kůže a sliznic

Jednou z látek obsažených v rakytníkovém oleji je i kyselina palmitoolejová, která je zároveň přirozenou složkou kůže. Díky složení rakytníkového oleje je možné vnitřním užíváním mírnit příznaky systémových onemocnění kůže, jako je např. atopická dermatitida ^[28]. Další možností využití rakytníkového oleje je topická aplikace přímo na místo poranění kůže. Tento způsob lokální aplikace se používá k hojení popálenin, ran,

vředů, či lehčích infekčních onemocnění kůže. Významná je i ochranná funkce proti UV slunečnímu záření a zároveň regenerační schopnosti rakytníkového oleje [29].

2.3.2 Antimikrobní účinky

Fenolické složky rakytníku představují hlavní skupinu látek s antibiotickým, ale i antivirovým efektem [4]. Tyto složky potlačují a redukuje jak gramnegativní, tak grampozitivní bakterie [30]. Rakytník našel své uplatnění v léčbě řady gynekologických potíží. Jedním z gynekologických problémů, vyskytující se zejména u žen po menopauze je atrofie poševní sliznice v souvislosti s nižším množstvím estrogenu v těle. Vaginální atrofii doprovází suchost sliznice a pálení, které perorální podání 3 g rakytníkového oleje denně prokazatelně zmírňuje [31]. Rakytníkový olej se v minulosti používal na léčbu zánětlivých onemocnění pohlavního ústrojí a při poškození vaginální sliznice se využívá i jeho lokálního podání [10].

2.3.3 Trávicí soustava

Rakytník urychluje regeneraci slizniční membrány v gastrointestinálním traktu, konkrétně dutiny ústní, žaludku či tlustého střeva. Už v tradiční medicíně se rakytníkové plody využívaly k léčbě žaludečních vředů pro jejich protizánětlivý efekt [30]. Mezi další pozitivní účinky rakytníku patří stimulace trávení, tvorba trávicích enzymů a sekrece žluči [10].

2.3.4 Imunitní systém

Rakytník řešetlákový posiluje odpověď imunitního systému organismu. Mezi složky, které se nejvíce podílejí na imunomodulačním efektu, patří flavonoidy [30]. Byla popsána zvýšená tvorba kostní dřeně po podání množství vybraných flavonoidů. Mishra a spol. [32] sledovali vliv flavonoidů obsažených v rakytníku na nespecifický imunitní systém *in vitro*. Výsledkem byla zvýšená produkce zejména interleukinu-6 (IL-6) a tumor nekrotizujícího faktoru- α (TNF- α). IL-6 i TNF- α patří mezi cytokiny (signální molekuly imunocytů) fagocytujících buněk a ovlivňují imunitní odpověď organismu na infekci, např. aktivují buňky zánětu [33].

2.3.5 Nádorová onemocnění

V některých studiích [34, 35] byl sledován vliv rakytníku na nekontrolované bujení rakovinotvorných buněk. Rakytník obsahuje různé typy látek (vitaminy C a E, karotenoidy

či flavonoidy) s antioxidační aktivitou. Tyto antioxidanty brání tvorbě volných radikálů, které běžně vyvolávají nádorové onemocnění příslušného orgánu. Oproti syntetickým preparátům, které se v medicíně používají k léčbě rakoviny, má přírodní látka výhodu v minimu nežádoucích účinků, které jsou u syntetického přípravku běžné a mnohdy velice závažné. Je nezbytné poznamenat, že protinádorový efekt přírodního produktu nebude tak výrazný jako u chemicky připravené látky ^[34].

2.3.6 Kardiovaskulární systém

Olej ze semen rakytníku je bohatý na polynenasycené mastné kyseliny, karotenoidy a flavonoidy. U těchto látek byly prokázány kardioprotektivní účinky ^[4]. Antioxidační efekt látek pozitivně ovlivňuje kardiovaskulární systém. Oxidativní stres je jedním z hlavních faktorů vzniku aterosklerózy, progresivního onemocnění cév. Vitamín E účinně působí proti oxidaci LDL cholesterolu. Ve studii ^[36] byl proveden pokus na myších, při kterém bylo zjištěno, že orální podávání 0,75 ml rakytníkového oleje ze semen po dobu 30 dní snižuje kromě rizika kardiovaskulárních chorob i zvýšený krevní tlak a množství cholesterolu v krvi.

2.3.7 Hepatoprotektivní účinky

Játra jsou vystavena mnoha xenobiotikům z řady polutantů a léků. To vše zatěžuje tento životně důležitý orgán, což může vést k oslabení či poškození funkce jater. U rakytníku byl pozorován pozitivní efekt na ochranu jater a léčbu jaterních onemocnění. Mezi časté hepatotoxiny patří ethanol, tetrachlormethan či paracetamol, které ve větším množství poškozují jaterní buňky. Proti tomuto poškození byl prokázán účinek několika látek obsažených v rakytníku. Patří mezi ně nenasycené mastné kyseliny, α – tokoferol a β – karoten. U flavonoidů byl pozorován vliv proti stenóze (zdučnění) jater ^[30].

2.4 Rakytníkový olej

Rakytníkové bobule je možné zpracovat několika rozdílnými způsoby za vzniku odlišných produktů. Kromě rakytníkového oleje existují rakytníkové šťávy, marmelády, čaje aj. ^[10]. Na podporu léčby onemocnění kůže, jako je atopický ekzém nebo opakující se dermatitida se používají krémy obsahující extrakty z rakytníku ^[30].

2.4.1 Složení rakytníkového oleje

Existují dva typy rakytníkového oleje. Rozlišují se podle toho, z jaké části plodů se rakytníkový olej získává – ze semen nebo z dužiny. Semenný i dužinový olej se liší svým obsahem mastných kyselin a dalších bioaktivních látek, jejichž srovnání mezi jednotlivými typy olejů je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2 Rozdíly ve složení rakytníkových olejů vyrobených ze semen a z dužiny

Látka obsažená v oleji z rakytníku	Množství látky v semenném oleji [% hm.]	Množství látky v dužinovém oleji [% hm.]
Mastné kyseliny		
• linolová ^[37]	30-40	~3,6
• α -linolenová ^[37]	20-35	~2,4
• olejová ^[38]	13-30 (~20,3 ^[37])	2-35 (~16,6 ^[37])
• stearová ^[38]	2-5	-
• palmitová ^[38]	15-20	17-47
• palmitoolejová ^[38]	-	16-54
Steroly celkem ^[38]	1-2	2-5
Tokoferoly		
• α -tokoferol ^[37]	~0,09	~0,08
• γ -tokoferol ^[37]	~0,12	~0,05
Karotenoidy		
• β -karoten ^[38]	0,10-0,50	0,02-0,10

Základní složkou olejů jsou nasycené a nenasycené mastné kyseliny. Chemické i fyzikální vlastnosti olejů jsou výrazně ovlivněny složením mastných kyselin. Podle počtu dvojných vazeb se nenasycené mastné kyseliny dále dělí na ty, jež obsahují jednu dvojnou vazbu – MUFA (mononenasycené mastné kyseliny), či dvě a více dvojných vazeb v řetězci – PUFA (polynenasycené mastné kyseliny) ^[39]. Nejznámější kyselinou ze skupiny MUFA je kyselina olejová. Co se týče PUFA řadí se sem fyziologicky významné řady omega-3 a omega-6 mastných kyselin, z nichž hlavními zástupci jsou kyselina linolová a kyselina α -linolenová ^[40]. Obě tyto kyseliny tvoří esenciální složku naší potravy, jelikož si je člověk neumí syntetizovat a jsou výrazně zastoupeny v rakytníkovém oleji ze semen. Naproti tomu dužinový olej vyniká významným množstvím kyseliny palmitoolejové, jak je taktéž

uvedeno v tabulce 2.

K výrobě rakytníkového oleje se využívá několik postupů. Tradiční metodou je lisování za studena, dále se používá metoda extrakce organickými rozpouštědly, jakým je např. hexan nebo extrakce superkritickou tekutinou – CO₂. Právě poslední zmíněná metoda je často užívána díky svým vysokým výnosům a její výhodou je i to, že v produktu nezůstávají zbytky rozpouštědel, jak může nastat v případě extrakce hexanem ^[37].

2.4.2 Stabilita a skladování olejů

Rakytníkový olej, stejně jako všechny rostlinné oleje mají charakteristickou vůni, chuť, barvu a nutriční vlastnosti, které mohou být ovlivněny způsobem skladování daného oleje. Během skladování dochází u rostlinných olejů k jejich degradaci a zhoršení jejich organoleptických vlastností. Tento jev označujeme jako žluknutí a je hlavně způsobeno oxidací vyšších mastných kyselin. U olejů obsahující PUFA dochází k oxidaci několikanásobně (až 20x) rychleji, než je tomu u MUFA ^[41]. U oxidovaných esenciálních mastných kyselin se vytrácí jejich nutriční a pro člověka fyziologicky prospěšný účinek. Je vhodné doprovázet příjem PUFA zvýšeným přísunem antioxidantů. Ty reagují s volnými radikály a zneškodňují je. Z nejběžnějších antioxidantů, které se nacházejí v rostlinných materiálech, jsou to především tokoferoly, karotenoidy, flavonoidy nebo kyselina askorbová.

Hlavní vliv na tvorbu nežádoucích produktů oxidace v rostlinných olejích mají teplota a světlo. Vhodně zvolený způsob uskladnění může výrazně zpomalit degradaci olejů. Často bývají oleje uchovávány v tmavých skleněných lahvích, které chrání obsah proti světlu. Stabilita olejů souvisí s jeho odolností vůči budoucím změnám. Úroveň oxidace v počátečních fázích po otevření dává nedostatečnou informaci o pozdějším chování oleje. Z tohoto důvodu, je hodnocení stability oleje vůči oxidaci považováno za důležitou charakteristiku ^[42]. Přírodní oleje jsou vyhledávanými produkty v potravinářském, kosmetickém i farmaceutickém průmyslu. Zatímco nasycené mastné kyseliny zvyšují chemickou stabilitu a bod tání olejů, vyšší obsah nenasycených mastných kyselin vede k nižší stabilitě i bodu tání ^[41].

2.4.3 Variabilita ve složení olejů

Na výsledné složení rakytníkových olejů má vliv řada faktorů. Jedním z nich je geografický původ rostliny. Jak bylo zmíněno v úvodu, je možné rakytník nalézt téměř

na všech kontinentech po celém světě, zejména v Asii a v Evropě. Rakytník je vysoce adaptabilní rostlina na biotické a abiotické stresové faktory. Kortesiemi a spol. [43] se zabývali rozdíly ve složení olejů z rakytníkových plodů získaných z Finska a z Kanady. Oleje z Finska, kde bývá obecně chladnější počasí, se vyznačovaly vyšším množstvím kyseliny askorbové, glukózy a chinové kyseliny. Kromě geografického původu, se na konečném složení bioaktivních látek odráží i konkrétní druh a kultivar jednotlivých rakytníků [16]. Dalšími faktory, které hrají důležitou roli na složení olejů, je doba sběru, respektive zralost plodů z kterých jsou tyto oleje vyrobeny nebo způsob zpracování.

2.5 Metody charakterizace tuků a olejů

K úplné charakterizaci slouží analýza např. chromatografickými metodami (HPLC, GC), které byly provedeny u vzorků olejů v práci Hurkové a spol. [44]. Tyto metody dávají dokonalejší informaci o vlastnostech analyzovaného materiálu.

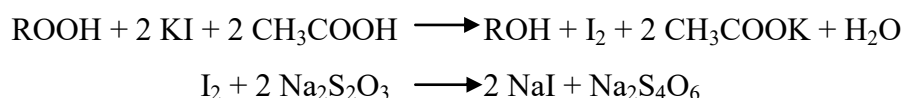
Základní informace o vlastnostech zkoumaných olejů nám podávají tuková, neboli konvenční čísla, která se používají k charakterizaci olejů a tuků, ať rostlinného či živočišného původu. Přehled hlavních tukových čísel je uveden v tabulce 3. Zjištěné hodnoty tukových čísel slouží k posouzení kvality olejů či pokrmových tuků. U olejů se sleduje celkový obsah tuků a jednotlivé zastoupení mastných kyselin. Přesné stanovení těchto čísel je uvedeno v českých státních normách (ČSN) a v International Organization for Standard (ISO normy) [45].

Tabulka 3 Hlavní tukových čísel, sledované parametry a související české státní normy

Tukové číslo	Vlastnosti tuků	ČSN
Peroxidové číslo	obsah polárních látek – tvorba (hydroxy)peroxidů	ČSN EN ISO 3960
Jodové číslo	obsah dvojných vazeb	ČSN EN ISO 3961
Číslo kyselosti	obsah volných mastných kyselin	ČSN EN ISO 660
Číslo zmýdelnění	obsah veškerých mastných kyselin	ČSN EN ISO 3657
Esterové číslo	obsah esterově vázaných mastných kyselin	
Hydroxylové číslo	obsah hydroxylových skupin	

2.5.1 Peroxidové číslo

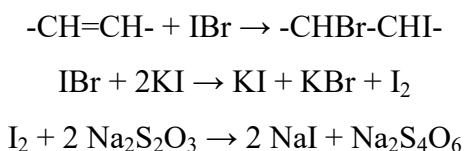
Peroxidové číslo slouží k posouzení žluklosti oleje. Peroxidové číslo je ukazatelem obsahu primárních produktů oxidace, charakterizuje obsah vytvořených peroxidů a hydroxyperoxidů. U olejů a tuků dochází působením vzdušného kyslíku na mastné kyseliny k oxidaci, která snižuje senzoryckou i nutriční hodnotu tuků. Tento efekt je nežádoucí, proto se snažíme mu zabránit správným skladováním a uchováváním olejů. Při oxidaci dochází ke ztrátě výživové hodnoty důležitých nenasycených mastných kyselin, které jsou v oleji obsaženy. Určení peroxidového čísla patří mezi metody kvantitativní a využívá jodometrického stanovení. Množství nežádoucích produktů je stanoveno metodou založenou na oxidaci jodidu draselného (hydroxy)peroxy v prostředí kyseliny octové a chloroformu. Celkový chemismus vyjadřují následující rovnice:



Množství látek oxidujících jodid draselný na jod se vyjadřuje v milimolech aktivního kyslíku na kilogram (mmol/kg) nebo v miligramech aktivního kyslíku na kilogram (mg/kg) či je udáváno množství aktivního kyslíku ($1/2 \text{ O}_2$) v miliekvivalentech obsažené v peroxidické formě v jednom kilogramu (mekv/kg) ^[46, 47].

2.5.2 Jodové číslo

Jodové číslo se používá k charakterizaci obsahu nenasycených mastných kyselin. Je definováno jako množství halogenu přepočteného na jod, které se váže na zkoumaný vzorek oleje. Používá se k zjištění původu tuků, jejich čistoty a kvality. Halogen se váže na dvojné vazby nenasycených mastných kyselin. Jod se aduje pomalu, proto není příliš vhodný pro toto stanovení. Brom a chlor jsou na druhou stranu příliš reaktivní, takže vedle adice probíhá i nežádoucí substituce. Bromid jodný, který se používá v Hanušově metodě, je svou reaktivitou přiměřený. Po reakci s tukem, se přidáním jodidu draselného nezreagovaný bromid jodný převede na jod. Nespotřebované množství halogenu se stanovuje titrací thiosíranem sodným za použití škrobového mazu jako indikátoru. Celkový chemismus vyjadřují následující rovnice:



Je známo několik metod stanovení jodového čísla (Hanušova, Wijsova aj.), v této práci bylo využito metody Hanušovy (viz. kapitola 4.4.2) ^[46, 47].

2.5.3 Číslo zmýdelnění

Zmýdelnění, neboli saponifikace, je proces, kdy dochází k rozkladu esterů tuků na příslušný alkohol a volné mastné kyseliny za působení alkálií ^[48]. Číslo zmýdelnění se využívá při zjištění celkového množství mastných kyselin, jak esterově vázaných, tak volných ^[49]. Vyjadřuje se jako množství hydroxidu draselného v miligramech, které je potřebné k neutralizaci volných mastných kyselin a k hydrolýze (zmýdelnění) esterů obsažených v 1 g látky. Se stoupajícím množstvím volných i vázaných mastných kyselin v olejích hodnota čísla zmýdelnění roste. Například pro slunečnicový olej jsou typické hodnoty od 188,0 až 194,0 mg_{KOH}/100 g ^[46, 47].

2.5.4 Číslo kyselosti

Oleje jsou po chemické stránce směsí esterů vyšších mastných kyselin a vyšších alifatických alkoholů. Mimo esterů, oleje obsahují i volné alkoholy, steroly, kyseliny aj. Číslo kyselosti udává množství volných mastných kyselin obsažených ve zkoumaném oleji ^[49]. Číslo kyselosti je definováno jako množství hydroxidu draselného v miligramech, které je potřeba k neutralizaci volných mastných kyselin obsažených v 1 g látky. Tyto hodnoty nebývají vysoké, například u slunečnicového oleje (*Helianthi oleum*) jsou typické hodnoty do 1,0 mg_{KOH}/100 g ^[46, 47]. Kvalita tuků a olejů s rostoucí hodnotou čísla kyselosti klesá.

2.5.5 Esterové číslo

Esterové číslo vyjadřuje obsah esterově vázaných mastných kyselin. Odpovídá množství hydroxidu draselného v miligramech, které je potřeba ke zmýdelnění esterů obsažených v 1 g látky. Lze jej vypočítat jako rozdíl čísla zmýdelnění a čísla kyselosti ^[46].

2.5.6 Hydroxylové číslo

Hydroxylové číslo udává množství hydroxidu draselného v miligramech, které

se spotřebuje při neutralizaci kyseliny vázané při acetylaci 1 g látky. Tato hodnota je ekvivalentní obsahu hydroxylových skupin ve zkoumaném vzorku [46].

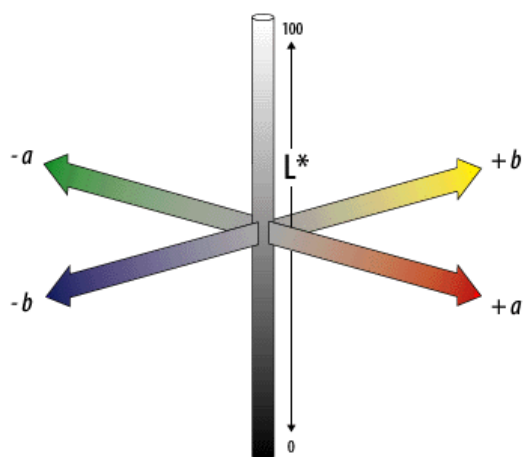
2.5.7 Měření barevnosti, kolorimetrické parametry

Barevný vjem je u každého subjektivní. Člověk jako pozorovatel, vnímá světlo a barevné odstíny pomocí fotoreceptorů umístěných na sítnici oka. Tyto receptory se nazývají tyčinky a čípky. Při nízkých intenzitách osvětlení, za šera, jsou za vnímání jasu odpovědné převážně tyčinky. U člověka se nacházejí tři druhy čípků, které slouží k barevnému vidění. Každý typ čípku je citlivý na jednu ze tří základních barev – červenou, zelenou nebo modrou [50].

Elektromagnetické spektrum zahrnuje záření všech možných vlnových délek. Viditelné spektrum zaujímá z tohoto spektra jen malou část v rozmezí 360 – 830 nm [51]. K objektivnímu popisu barev se využívá metoda kolorimetrie, která se snaží popsat barvu pomocí určitých parametrů. Tyto parametry je možné mezi sebou porovnávat. K objektivnímu hodnocení barev je nejprve nutné definovat tři elementy, jimiž jsou zdroj světla, pozorovaný objekt a pozorovatel [52].

Pro kolorimetrické vyhodnocování bylo mezinárodní komisí pro osvětlování definováno několik standardizovaných zdrojů světla. Každý světelný zdroj je charakterizován spektrální intenzitou vyzařování. Denní osvětlení charakterizuje například zdroj D65. Tento zdroj komise CIE doporučuje používat kdykoliv je to možné. [51]. Číslo 65 určuje takzvanou teplotu chromatičnosti. Dále se rozlišují i jiné světelné zdroje, jako například žárovka (A) nebo zářivka (F).

Mezinárodní komise pro osvětlování definovala roku 1976 metodu $L^* a^* b^*$, která bývá zkráceně označována jako CIE LAB a využívá se v hodnocení barevnosti materiálů. Tato metoda byla rovněž použita v této práci. (Existují i jiné metody, například soustava CIE LUV, která bývá využívána v oborech světelných zdrojů, ve fotografii, televizi, či polygrafické reprodukci barev [53]). $L^* a^* b^*$ jsou souřadnice barvového prostoru, kde parametr L^* určuje, zda se jedná o barvu světlou či tmavou. Souřadnice a^* a b^* popisují barevný odstín. Na ose a^* se nacházejí barvy od zelené po červenou. Osa b^* charakterizuje barevné odstíny modré až žluté. Všem barvám, které jsme schopni jako pozorovatelé vnímat, můžeme přiřadit konkrétní souřadnice. Jednotlivé souřadnice a jim odpovídající barvy jsou názorně zobrazeny na obrázku 7.



Obrázek 7 Kolorimetrické souřadnice dle CIE LAB
 $L^* a^* b^*$
 Převzato z: [54]

3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo v rámci literární rešerše popsat vlastnosti, složení a metody charakterizace rakytníkových olejů. V praktické části bylo cílem zjistit obecné charakteristiky u komerčně dostupných rakytníkových olejů různých obchodních značek. Obecné charakteristiky olejů zahrnovaly měření tukových čísel titračními a spektrofotometrickými metodami.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Použité vzorky

Jako analyzované materiály byly použity tři různé vzorky komerčně dostupných rakytníkových olejů (obrázek 8).

- Rakytníkový olej, Harmonic series, Elith Phito (dále olej 1)

země původu: Ukrajina

datum spotřeby: 31. 7. 2018, šarže: 810716

- Rakytníkový olej, Relikt – Art Engel s.r.o.

země původu: Česká republika

datum spotřeby: 2. 10. 2018 (dále olej 2)

- Rakytníkový olej 100%, Virde spol. s.r.o.

země původu: Česká republika

datum spotřeby: 24. 9. 2018 (dále olej 3)



Obrázek 8 Vzorky rakytníkových olejů použitých k analýze

U vzorku 1 je z údajů uvedených na obalu patrné, že se jedná o 100% olej pocházející z plodů rakytníku. Tento olej byl lisovaný za studena a je zde uvedeno i jeho podrobné složení (komplex PUFA 65 %, MUFA 24 %, nasycených mastných kyselin 10,5 %, z toho kyselina linolová 65 %, olejová 24 %, palmitová 6,2 %, stearová 3,6 %; β -karoten 14 mg, α -tokoferol 5,8 mg, kyselina askorbová 14 mg v 10 ml oleje).

Údaje na obalu u vzorku 2 poskytují informaci pouze o původu oleje a to, že se jedná o olej z plodů rakytníku řešetlákového.

Olej 3 obsahuje stejně jako vzorek 1 100% olej z rakytníku, ovšem oproti druhým

je vyroben ze semen. Je lisovaný za studena a obsahuje 180 mg/ 100 g karotenoidů, dále je zde uvedeno množství 25 mg α -tokoferolu na 5 ml oleje.

4.2 Použité chemikálie

- Azid sodný p.a. (Penta, Česká republika)
- Destilovaná voda
- Dichroman draselný čistý (Lachema, Česká republika)
- Ethanol 96% p.a. (Penta, Česká republika)
- Fenolftalein roztok (Lach-ner, Česká republika)
- Hanušovo činidlo – roztok 0,1 mol IBr/I v kyselině octové (P-lab a.s., Česká republika)
- Hydroxid draselný p.a. (Penta, Česká republika)
- Chlorid vápenatý p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)
- Chloroform p.a. stab. s amylem (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)
- Jodid draselný p.a. (Lachema, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)
- Kyselina octová 99% p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)
- Kyselina šťavelová p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)
- Methylčerveň roztok (Penta, Česká republika)
- Methyloranž roztok (Penta, Česká republika)
- Petrolether čistý (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)
- Škrobový maz (Lachema, Česká republika)
- Tetraboritan sodný p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)
- Thiosíran sodný p.a. (Lachema, Česká republika)
- Uhličitan sodný p.a. (Penta, Česká republika)

4.3 Použitá zařízení a software

- Automatická byreta Schott TITRONIC®, Německo
- Mikropipety (100 – 1000 μ l)
- Byreta – Vitlab Bürette, Německo

- Digitální váhy 40SM-200 – PESA, Švýcarsko
- Spektrofotometr SPECORD® 250 PLUS, Analytik Jena, Německo
- Křemenné kyvety (optické délky 0,1 a 2,0 mm)
- Zpětný chladič
- Vařič
- Program WinASPECT® PLUS.
- Program ChemSpider^[20]

4.4 Použité metody a příprava roztoků pro jednotlivá stanovení

Při stanovení tukových čísel, bylo postupováno dle metod uvedených v Českém lékopise^[46], pokud není uvedeno jinak.

4.4.1 Stanovení peroxidového čísla

V tomto případě bylo postupováno metodou popsanou v práci^[55] K. Vinklerové. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo přibližně přesně 1,2 g vzorku oleje, k němuž bylo přidáno 25 ml směsi kyseliny octové:chloroformu (1:1 obj.). Po promíchání a rozpuštění vzorku, byl ke směsi přidán 1 ml nasyceného roztoku jodidu draselného a roztok byl opět promíchán. Uzavřená baňka byla ponechána 5 minut ve tmě. Po uplynutí této doby bylo k roztoku přidáno 75 ml destilované vody, 2 ml škrobového mazu a vyloučený jód byl titrován standardizovaným roztokem thiosíranu sodného o koncentraci 0,01 mol/l do odbarvení indikátoru. Peroxidové číslo se vypočte podle rovnice 1.

$$\text{Peroxidové číslo} = \frac{(a-b) \cdot c \cdot 1000}{m} \quad [\text{mekv. aktivního O}_2/\text{kg}] \quad (1)$$

Kde:

a – spotřeba 0,01 M Na₂S₂O₃ na vlastní stanovení [ml]

b – spotřeba 0,01 M Na₂S₂O₃ na slepý pokus [ml]

c – přesná koncentrace Na₂S₂O₃ [mol/l]

m – navážka vzorku [g]

Stanovení bylo provedeno u každého vzorku 3x.

Příprava roztoků:

- *Odměrný roztok 0,01mol/l thiosíranu sodného*

Pro přípravu zásobního odměrného roztoku bylo naváženo přesně přibližně 2,482 g thiosíranu sodného. Tato navážka byla rozpuštěna destilovanou vodou, převedena do odměrné baňky (1000 ml) a doplněna po rysku. Pro vyšší stabilizaci bylo do roztoku přidáno asi 0,2 g pevného uhličitanu sodného. Takto připravený roztok byl důkladně promíchán.

- *Standardizace 0,01mol/l thiosíranu sodného*

Standardizace odměrného roztoku, byla provedena na základní látku dichroman draselný. Na předpokládanou spotřebu 10,0 ml, byl navážen dichroman draselný v množství blízkému 4,904 mg. Toto množství bylo převedeno do titrační baňky se zábrusovým uzávěrem a rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Dále byl k roztoku přidán 1 g pevného jodidu draselného a 10 ml kyseliny chlorovodíkové zředěné destilovanou vodou (1:1 obj.). Baňka byla uzavřena, protřepána a ponechána po dobu 5 min na tmavém místě. Po uplynutí této doby byla zátka opláchnuta destilovanou vodou a obsah byl titrován 0,1mol/l thiosíranem sodným do žlutého zbarvení. Následně bylo přidáno 0,5 ml škrobového mazu a roztok byl dotitrován z modrého zbarvení do zeleného. Ze spotřeby thiosíranu byla vypočtena přesná koncentrace odměrného roztoku. Titrace byla provedena 3x

- *Nasycený roztok jodidu draselného*

K odměřenému množství destilované vody bylo přidáno takové množství jodidu draselného, dokud se látka rozpouštěla.

- *Škrobový maz*

Navážené 2 g bramborového škrobu a přibližně 0,01 g konzervační látky NaN_3 bylo rozmícháno a rozpuštěno v zhruba 10 ml destilované vody. Suspenze byla za míchání převedena do 0,5 l vroucí vody a povařena. Po vychladnutí se čirý roztok odlil od usazené sedliny. Kapkou jodu se škrobový maz zabarvoval modře.

4.4.2 Stanovení jodového čísla podle Hanuše

Do zábrusové Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo přibližně přesně 0,2 g rakytníkového oleje. K oleji bylo přidáno 15 ml chloroformu a 25 ml Hanušova činidla (jodmonobromidový roztok). Baňka byla uzavřena zábrusovou zátkou a obsah baňky byl promíchán a ponechán po dobu 30 minut v temnu. Poté byla zátka opláchnuta

destilovanou vodou do baňky. K roztoku bylo přidáno 20 ml 10% (w/w) roztoku jodidu draselného a poté bylo přidáno 100 ml destilované vody ^[55]. Obsah baňky byl titrován 0,1 mol/l odměrným roztokem thiosíranu sodného do žlutého zbarvení. Následně byly přidány 2 ml škrobového mazu a roztok byl titrován do odbarvení vodné fáze. Slepý pokus byl proveden stejným postupem, ale bez vzorku oleje. Jodové číslo bylo vypočteno dle rovnice 2.

$$\text{Jodové číslo} = \frac{(a-b) \cdot c \cdot M}{m \cdot 10} \text{ [g/100 g]} \quad (2)$$

Kde:

- a – spotřeba 0,1 M Na₂S₂O₃ na slepý pokus [ml]
- b – spotřeba 0,1 M Na₂S₂O₃ na vlastní stanovení [ml]
- m – navážka vzorku [g]
- c – přesná koncentrace Na₂S₂O₃ [mol/l]
- M – molární hmotnost jódu [g/mol]

Stanovení bylo provedeno u každého vzorku 3x.

Příprava roztoků:

- *Odměrný roztok 0,1 mol/l thiosíranu sodného*

Pro přípravu 1000 ml zásobního odměrného roztoku bylo naváženo přibližně 24,82 g thiosíranu sodného. Po rozpuštění navážky v destilované vodě a převedení do odměrné baňky o objemu 1000 ml, byla baňka doplněna po rysku. Pro vyšší stabilizaci bylo k roztoku přidáno asi 0,2 g pevného uhličitanu sodného. Připravený roztok byl důkladně protřepán.

- *Standardizace 0,1 mol/l thiosíranu sodného*

Standardizace byla provedena stejným způsobem jako v kapitole 4.4.1 s tím rozdílem, že bylo naváženo přibližně 98,07 mg dichromanu draselného na předpokládanou spotřebu 20 ml.

- *Roztok 10% jodidu draselného*

K 20 ml destilované vody byl přidán 2 g pevného jodidu draselného a rozpuštěn.

4.4.3 Stanovení čísla zmydelnění

Do 50 ml srdcovité baňky bylo kvantitativně převedeno 2,5 g naváženého vzorku.

K němu se poté přidalo 25,0 ml 0,5 mol/l hydroxidu draselného v ethanolu. Tento roztok se po připojení zpětného chladiče vařil 30 min. Po uplynutí této doby, bylo do roztoku přidáno 0,5 ml fenolftaleinu a ještě horký roztok se titroval 0,5mol/l kyselinou chlorovodíkovou do zmizení růžového zabarvení. Slepá zkouška byla provedena za stejných podmínek, bez zkoušeného vzorku. Číslo zmydelnění se vypočítá podle vzorce 3:

$$\text{Číslo zmydelnění} = \frac{(b-a) \cdot M \cdot c}{m} \text{ [mg/g]} \quad (3)$$

Kde.

a – spotřeba kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l při vlastním stanovení [ml]

b – spotřeba kyseliny chlorovodíkové 0,5 mol/l při slepé zkoušce [ml]

m – navážka zkoušené látky [g]

M – molární hmotnost HCl [g/mol]

c – koncentrace HCl [mol/l]

Stanovení bylo provedeno u každého vzorku 3x.

Příprava roztoků:

- *Roztok 0,5mol/l hydroxidu draselného v ethanolu*

Pro přípravu 250 ml roztoku 0,5mol/l hydroxidu draselného v ethanolu, bylo naváženo přibližně 7,014 g pevného KOH. Toto množství bylo rozpuštěno v malém množství vody a doplněno 96% ethanolom do 250 ml ^[46].

- *Odměrný roztok 0,5mol/l kyseliny chlorovodíkové*

Pro přípravu 500 ml roztoku bylo odpipetováno 22,1 ml 35% kyseliny chlorovodíkové a toto množství bylo přidáno k asi 100 ml destilované vody v odměrné baňce. Poté byla baňka doplněna destilovanou vodou po rysku a řádně promíchána.

- *Standardizace 0,5mol/l kyseliny chlorovodíkové*

Standardizace kyseliny chlorovodíkové byla provedena na primární standard tetraboritan sodný. Na předpokládanou spotřebu 20 ml bylo přibližně naváženo 1,907 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Navážené množství bylo kvantitativně převedeno do titrační baňky a doplněno destilovanou vodou do asi 50 ml. Poté se přidalo několik kapek methylčerveně a roztok byl titrován odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové do červeného zabarvení ^[56]. Ze spotřeby kyseliny chlorovodíkové byla vypočtena

přesná koncentrace odměrného roztoku. Titrace byla provedena 3x.

4.4.4 Stanovení čísla kyselosti

Číslo kyselosti bylo stanoveno pomocí modifikovaného lékopisného postupu (pro úsporu materiálu) ^[46]. Nejprve bylo naváženo 5,0 g zkoušeného vzorku oleje. Toto množství bylo rozpuštěno v 25 ml směsi 96% ethanolu a petroletheru (1:1 obj.) předem zneutralizované 0,1mol/l hydroxidem draselným. Jako indikátor byl použit fenolftalein. Po rozpuštění oleje byl vzorek titrován 0,1mol/l hydroxidem draselným do vzniku růžového zbarvení, které bylo stálé nejméně 15 s. Číslo kyselosti se následně vypočítá dle rovnice 4:

$$\text{Číslo kyselosti} = \frac{a \cdot M \cdot c}{m} \text{ [mg/g]} \quad (4)$$

Kde:

a – spotřeba 0,1 M KOH na vlastní stanovení [ml]

m – navážka vzorku [g]

M - molární hmotnost KOH [g/mol]

c - koncentrace KOH [mol/l]

Stanovení bylo provedeno u každého vzorku 3x.

Příprava roztoků:

- *Odměrný roztok 0,1mol/l hydroxidu draselného*

Nejprve bylo naváženo přibližně 1,403 g hydroxidu draselného. Toto množství bylo převedeno do odměrné baňky o objemu do 250 ml. Po rozpuštění v menším množství destilované vody, byla baňka doplněna vodou do 250 ml po rysku.

- *Standardizace 0,1mol/l hydroxidu draselného*

Standardizace byla provedena na základní látku pevnou kyselinu šťavelovou. Pro spotřebu odměrného roztoku 20 ml, bylo naváženo přibližně přesně 0,1261 g $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Navážka byla převedena do titrační baňky, do které bylo přidáno 50 ml destilované vody a 5 kapek methyloranže. Po rozpuštění kyseliny šťavelové, byl roztok titrován odměrným roztokem hydroxidu draselného do oranžového zbarvení. Před ekvivalencí bylo přidáno 10 ml 20% chloridu vápenatého a roztok byl dotitrován

do žlutého zabarvení.

- *Roztok 20% chloridu vápenatého*

K 10 ml destilované vody byly přidány 2 g chloridu vápenatého.

4.5 Měření barevnosti

K porovnání barevnosti vzorků rakytníkových olejů byl použit spektrofotometr SPECORD® 250 PLUS. K tomuto přístroji byl připojen počítač, kde byl nainstalován ovládací program - WinASPECT® PLUS, který mimo jiné umožňuje stanovení kolorimetrických parametrů. Pro získání absorpčních spekter olejů byly oleje měřeny při vlnových délkách 250 – 650 nm, k zjištění kolorimetrických parametrů byla využita celá viditelná oblast spektra, tj. 380 – 780 nm. Oleje byly měřeny v 0,1 mm křemenné kyvetě, pouze u vzorku č. 2 byla při měření absorpčních spekter použita kyveta o optické délce 2 mm. Referenční látkou byla zvolena destilovaná voda. Hodnoty absorbancí se zaznamenávaly s krokem 2 nm a rychlost snímání nastavena na 5 nm/s.

Při měření kolorimetrických parametrů L^* a b^* , byl zvolen zdroj světelného záření D65, tedy denní světlo a pozorovatel 10 úhlových stupňů. Tyto parametry byly zvoleny v souvislosti s kapitolou 2.5.7, kde jsou i popsány.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Tuková čísla

Záměrem experimentu bylo zjištění charakteristických tukových čísel pro tři vzorky komerčně dostupných rakytníkových olejů. Nejprve bylo změřeno peroxidové číslo pro jednotlivé vzorky a zkoumán vliv podmínek skladování na jejich stabilitu. Vzorky všech tří olejů byly rozděleny na dvě části, přičemž jedna část byla skladována v chladu a druhá část při laboratorní teplotě. Dále byla zjišťována čísla jodová, čísla zmýdelnění, čísla kyselosti a esterová čísla. Poslední čtyři uvedená čísla byla zjišťována pouze pro vzorky skladované v chladu.

5.1.1 Peroxidové číslo

Peroxidové číslo je ukazatelem jakosti a stability oleje. Pro stanovení peroxidového čísla u rakytníkových olejů byla zjišťována stabilita měřených vzorků po dobu dvou měsíců. Během těchto dvou měsíců byl každý vzorek změřen 7x. Byl zjišťován vliv teploty a světla na skladování jednotlivých vzorků. Vzorky byly uloženy v chladicím zařízení při teplotě 3 – 5 °C a souběžně byly sledovány vzorky uložené při laboratorní teplotě a vystavené dennímu světlu. Všechny vzorky byly uchovávány v originálních obalech, tedy v tmavých skleněných lahvích se šroubovacím uzávěrem. V následujících tabulkách jsou uvedena zjištěná peroxidová čísla s vypočítanými směrodatnými odchylkami vzorků skladovaných na světle, za laboratorních podmínek (tabulka 4) a vzorků uložených ve tmě a chladu (tabulka 5).

Tabulka 4 Peroxidová čísla s vypočítanými směrodatnými odchylkami u vzorků skladovaných za laboratorních podmínek, na světle

Dny po otevření	Peroxidové číslo vzorku 1 [mekv/kg]	Peroxidové číslo vzorku 2 [mekv/kg]	Peroxidové číslo vzorku 3 [mekv/kg]
0	12,68 ± 0,53	2,95 ± 0,42	8,97 ± 0,24
4	12,99 ± 1,31	3,13 ± 0,42	9,15 ± 0,24
8	14,90 ± 0,57	3,14 ± 0,23	14,76 ± 0,08
16	21,49 ± 0,44	3,16 ± 0,10	25,64 ± 0,07
25	29,69 ± 1,15	3,18 ± 0,03	36,37 ± 0,24
40	39,12 ± 0,93	3,61 ± 0,29	49,58 ± 0,81
60	48,73 ± 0,95	5,98 ± 0,10	83,27 ± 3,00

Porovnáním naměřených hodnot peroxidových čísel u rakytníkových olejů v den otevření, lze pozorovat výrazně nižší peroxidové číslo u oleje 2 oproti ostatním olejům. Zajímavostí je, že se tento olej liší od ostatních i svou odolností vůči oxidaci. Peroxidová čísla u vzorku 2 se v průběhu otevření a skladování na světle příliš nemění, což značí o jeho stabilitě. Z dat uvedených v tabulce 4 je hlavně u olejů 1 a 3 vidět nárůst hodnoty peroxidových čísel s rostoucí dobou od jejich otevření. Největší změny byly pozorovány u rakytníkového oleje české značky Virde (vzorek 3). U vzorku č. 3 se po dvou měsících po otevření a skladování za laboratorní teploty na světle vytvořilo téměř desetinásobné množství hydroxyperoxidů a peroxidů. Tento vysoký nárůst může být způsoben velkým množstvím nenasycených mastných kyselin obsažených v oleji, které mohly zoxidovat a vytvořit tak produkty oxidace. Rakytníkový olej dva měsíce po otevření nebude pravděpodobně tak bohatý na bioaktivní látky, jako ihned po otevření s ohledem na zjištěné zvyšující se peroxidové číslo. Z teorie vyplývá, že čím je peroxidové číslo nižší, tím je menší i obsah primárních produktů oxidace. Malé změny v hodnotách peroxidového čísla, měřených v průběhu dvou měsíců u oleje 2, odpovídají nízkému obsahu primárních produktů oxidace.

U všech vzorků oleje můžeme sledovat rostoucí tendenci hodnot peroxidových čísel, což koresponduje s očekáváním a s dostupnou literaturou ^[57].

Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 90/2000 Sb. udává obecně pro všechny rostlinné tuky a oleje maximální hodnotu peroxidového čísla 10,0 mekv/kg a pro oleje lisované za studena maximálně do 15,0 mekv/kg. Jediný vzorek, který po otevření přesahoval hodnotu 10,0 mekv/kg byl vzorek 1, jelikož je však tento olej lisovaný

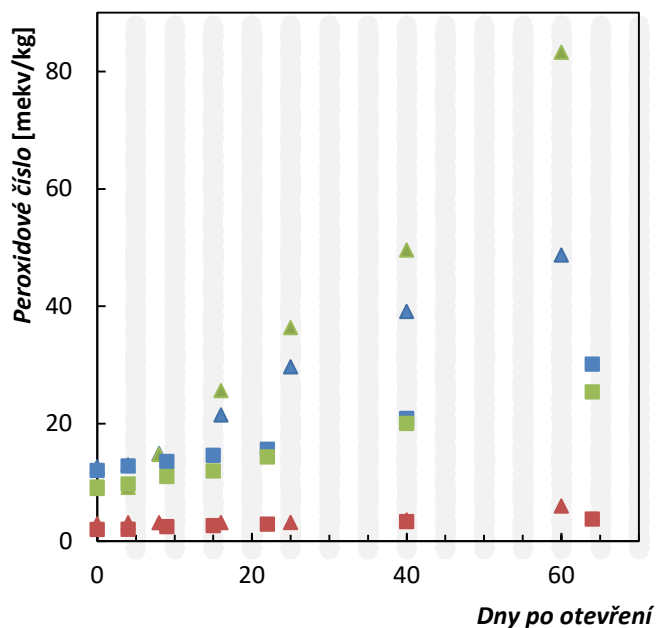
za studena, tak i tento splňuje maximální hodnoty peroxidového čísla u rostlinných olejů určených ke konzumaci.

Tabulka 5 Peroxidová čísla a vypočítané směrodatné odchylky u vzorků skladovaných v chladu

Dny po otevření	Peroxidové číslo vzorku 1 [mekv/kg]	Peroxidové číslo vzorku 2 [mekv/kg]	Peroxidové číslo vzorku 3 [mekv/kg]
0	12,04 ± 0,94	1,99 ± 0,94	9,21 ± 0,12
4	12,80 ± 0,10	2,02 ± 0,19	9,73 ± 0,08
9	13,57 ± 0,31	2,47 ± 0,17	11,01 ± 0,49
15	14,62 ± 0,14	2,64 ± 0,07	11,95 ± 0,41
22	15,65 ± 0,65	2,89 ± 0,03	14,34 ± 0,26
40	20,90 ± 0,10	3,33 ± 0,11	20,05 ± 0,25
64	30,15 ± 1,00	3,76 ± 0,22	25,42 ± 1,23

V tabulce 5 můžeme opět pozorovat rozdílné hodnoty peroxidových čísel, tentokrát měřených v chladu a temnu. Odlišnosti mezi peroxidovými čísly v čase 0 u jednotlivých olejů, jsou víceméně v mezích experimentální chyby. Může se ale také jednat o odlišnosti ve složení olejů v rámci jedné šarže (např. chybou ve vzorkování).

I u vzorků skladovaných v chladu, můžeme pozorovat tendenci k růstu peroxidového čísla, s výjimkou oleje 2. Nárůst těchto hodnot však není tak markantní, jako za laboratorních podmínek. U olejů 1 a 3 se množství vytvořených (hydroxy)peroxidů po dvou měsících uchovávaných za jiných podmínek liší poměrně výrazně. U vzorku 3 je to více než trojnásobně. U vzorku 2 pozorujeme obdobnou stabilitu jako za laboratorních podmínek. Je možné, že byly k tomuto vzorku oleje přidány antioxidanty pro udržení stability.



Obrázek 9 Vliv teploty skladování vzorků rakytníkových olejů na výsledné peroxidové číslo; barevné trojúhelníky značí vzorky skladované za laboratorních podmínek za světla (olej 1, olej 2, olej 3), barevné čtverce značí vzorky olejů skladované v chladu, ve tmě (olej 1, olej 2, olej 3)

Obrázek 9 shrnuje všechna naměřená peroxidová čísla olejů uchovávaných v chladu i za laboratorních podmínek.

5.1.2 Jodové číslo

Jodové číslo charakterizuje celkové množství nenasycených mastných kyselin ve vzorku. Čím je jeho hodnota vyšší, tím více významných biologicky aktivních nenasycených sloučenin olej obsahuje. Všechny zkoumané oleje obsahují srovnatelné množství celkových nenasycených mastných kyselin odpovídající rozmezí od 125,7 do 131,0 g_{jodu}/100 g, přičemž nejnižší množství bylo změřeno ve druhém vzorku oleje. Hodnoty jodových čísel u rakytníkových olejů změřených pomocí Hanušovy metody jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 Hodnoty změřených jodových čísel Hanušovou metou s vypočítanými směrodatnými odchylkami u vzorků olejů z rakytníku

Vzorek č.	Jodové číslo [g _{jodu} /100g _{vzorku}]
1	131,0 ± 3,3
2	125,7 ± 0,3
3	129,5 ± 1,0

Pro srovnání je možno uvést, že jodové číslo běžně používaného slunečnicového oleje má hodnotu 124,7 g_{jodu}/100 g ^[58], v jiných studiích je uváděna hodnota až 134,3 g_{jodu}/100 g ^[59]. Mezi další rostlinné oleje, které se obvykle používají pro domácí potřeby patří nepochybně olej olivový. Tento olej se od rakytníkového i slunečnicového oleje svými hodnotami liší poměrně výrazně. Studie uvádějí hodnoty okolo 80,0 g_{jodu}/100 g ^[58, 59]. Je to dáno především složením mastných kyselin jednotlivých olejů. Zatímco olivový olej obsahuje z nenasycených kyselin převážně kyselinu olejovou, slunečnicový olej obsahuje kromě kyseliny olejové větší množství kyseliny linolové ^[46]. Kyselina olejová na rozdíl od kyseliny linolové, která patří mezi dienové kyseliny, obsahuje ve své molekule dvojnou vazbu pouze jednu. Složení rakytníkových olejů jsou uvedeny v tabulce 2.

Podle studie z roku 2007 se jodové číslo rakytníkového oleje pohybuje od 63 – 125 g_{jodu}/100 g ^[60] v závislosti na tom, zda byl rakytníkový olej získán ze semen, či dužiny. Jiná studie uvádí hodnoty okolo 150 g_{jodu}/100 g ^[61]. V této práci naměřené hodnoty jodových čísel se od těchto hodnot příliš neliší. Z výše uvedené tabulky vyplývá, že hodnoty jodových čísel se u jednotlivých vzorků významně neliší a srovnáním s dostupnou literaturou ^[60] odpovídají spíše olejům vyrobených ze semen.

5.1.3 Číslo zmydlení

Číslo zmydlení bylo měřeno po 3 měsících od otevření olejů, které byly mezitím skladovány v chladu. Toto číslo odráží množství veškerých mastných kyselin ve vzorku. Jeho velikost roste se stoupajícím množstvím volných a vázaných mastných kyselin v olejích. Zjištěné hodnoty čísel zmydlení s vypočítanými směrodatnými odchylkami jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7 Naměřené hodnoty čísel zmýdelnění s vypočítanými směrodatnými odchylkami vzorků olejů z rakytníku

Vzorek č.	Číslo zmýdelnění [mg _{KOH} /g _{vzorku}]
1	193,45 ± 1,00
2	161,25 ± 1,47
3	192,01 ± 0,73

I v tomto případě se vzorek 2 od ostatních značně liší. Zatímco oleje 1 i 3, mají číslo zmýdelnění velmi blízké a oba vyšší než 190 mg_{KOH}/g, u oleje 2 byla naměřena hodnota 161 mg_{KOH}/g. Tato nízká hodnota neodpovídá ani číslům zmýdelnění naměřených v jiných pracích. Dle studie ^[60] se hodnoty čísla zmýdelnění u rakytníkového oleje pohybují od 181 – 196 mg_{KOH}/g, což je ve shodě s vlastním měřením u vzorků 1 a 3. V jiné studii uvádějí hodnotu dokonce 230 mg_{KOH}/g ^[61]. Změřená hodnota čísla zmýdelnění u vzorku 2 byla pravděpodobně způsobena menším obsahem mastných kyselin. Z předchozích měření jodového čísla vyplývá, že vzorek 2 obsahuje podobné množství nenasycených mastných kyselin, jako vzorky 1 a 3, ovšem na obsah nasycených mastných kyselin je chudší. Kromě triacylglycerolů obsahují oleje z rakytníku i výrazné množství nezmýdelnitelných složek.

5.1.4 Číslo kyselosti

Číslo kyselosti se používá jako měřítko stupně žluknutí tuků a olejů. Vyšší hodnoty znamenají horší kvalitu daných olejů. Při stárnutí tuků a olejů dochází ke štěpicím procesům v triacylglycerolech ^[57]. Uvolnění mastných kyselin vede ke zvýšení čísla kyselosti. Pro všechny tři vzorky, byly zjištěny relativně nízké hodnoty čísel kyselosti, které jsou uvedeny v tabulce 8. V dostupných studiích byly zjištěny hodnoty čísla kyselosti okolo hodnoty 4,0 mg_{KOH}/g, ale i vyšší ^[60, 61]. Takto nízké hodnoty neodpovídají hodnotám uvedeným v literatuře. Vzhledem ke skutečnosti, že oleje byly měřeny po třech měsících od otevření, byly hodnoty čísla kyselosti očekávány daleko vyšší. Důvodem rozdílných hodnot čísel kyselosti oproti publikovaným údajům může být rozdílné složení mezi oleji použitých pro analýzu Kaushalem a spol. ^[61] a vzorky olejů použitých v této práci.

Tabulka 8 Změřené hodnoty čísel kyselosti s vypočítanými směrodatnými odchylkami vzorků olejů z rakytníku

Vzorek č.	Číslo kyselosti [mg _{KOH} /g _{vzorku}]
1	0,45 ± 0,02
2	0,43 ± 0,03
3	0,31 ± 0,03

Výše uvedená tabulka naznačuje, že zkoumané rakytníkové oleje jsou kvalitní a nedochází u nich k přílišnému žluknutí.

5.1.5 Esterové číslo

Esterové číslo je rozdílem čísla zmýdelnění a čísla kyselosti. Znázorňuje, kolik je ve vzorku mastných kyselin ve formě esterů. Jelikož se číslo kyselosti u všech měřených vzorků olejů pohybuje okolo 0,4 mg_{KOH}/g (viz tabulka 9), je patrné, že naprostá většina mastných kyselin je právě ve formě esterů.

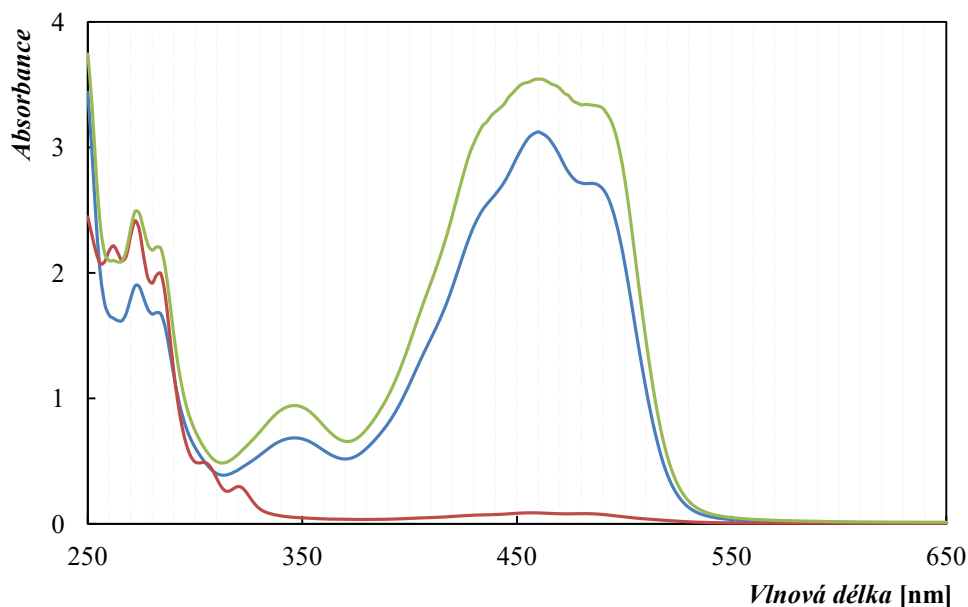
Tabulka 9 Vypočítané hodnoty esterového čísla u vzorků olejů z rakytníku

Vzorek č.	Esterové číslo [mg _{KOH} /g _{vzorku}]
1	193,00
2	160,80
3	191,70

5.2 Měření barevnosti, kolorimetrické parametry

Byla proměřena spektra ve viditelné a UV oblasti u všech vzorků rakytníkových olejů. Již ze subjektivního pozorování bylo možné soudit na mnohem světlejší odstín rakytníkového oleje č. 2. Tento odhad se následně potvrdil i po proměření jednotlivých absorpčních spekter na spektrofotometru, jak je možné vidět na obrázku 10. Oleje 1 a 3 vykazovaly shodně absorpční maximum při vlnové délce 460 nm, jak u vzorků uchovávaných v lednici, tak za laboratorních podmínek. U oleje 2 byly absorpční maxima obdobná a to u oleje uchovávaného v chladu při vlnové délce 456 nm a 458 nm

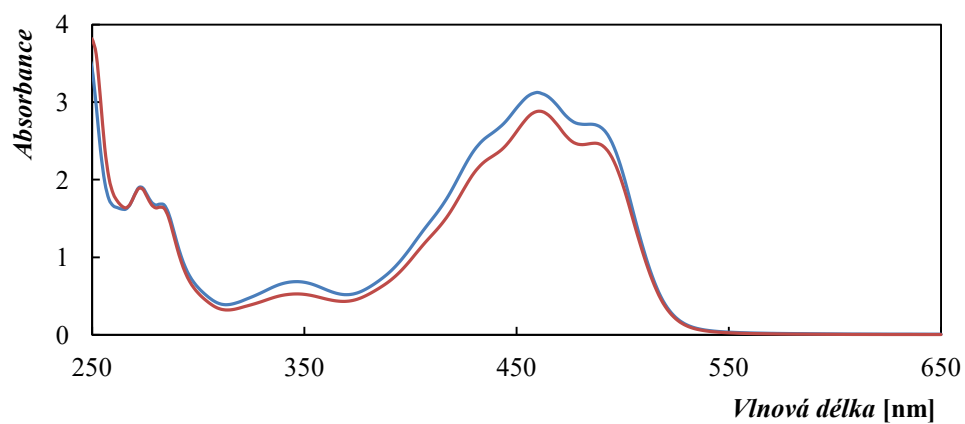
za laboratorních podmínek. Tyto hodnoty odpovídají žluté barvě. Ve viditelné oblasti se jako žlutá jeví látka mající maxima absorpce v rozmezí od 435 – 480 nm. Hned za tímto rozmezím následuje rozsah 480 – 490 nm, který odpovídá oranžové doplňkové barvě ^[62].



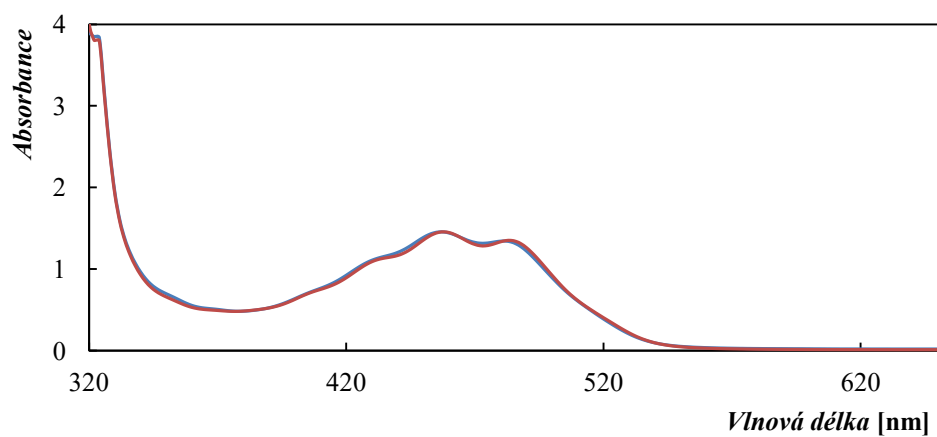
Obrázek 10 Naměřené UV-VIS spektrum jednotlivých vzorků olejů (olej 1, olej 2, olej 3) v rozmezí vlnových délek 250 – 650 nm, optická délka kyvety 0,1 mm

Z obrázku 10 je patrné, že vzorky rakytníkových olejů 1 a 3 pohlcují světlo mnohem intenzivněji než vzorek 2, který je výrazně světlejší. Kvůli vysoké optické hustotě vzorů 1 a 3, musely být oleje proměřeny v nejmenší dostupné kyvetě o optické délce 0,1 mm. I v této kyvetě však tyto vzorky dosahují vysokých hodnot absorpce. V krátkovlnné oblasti vidíme u všech vzorků vyšší absorpce, což by mohlo signalizovat možné příměsi.

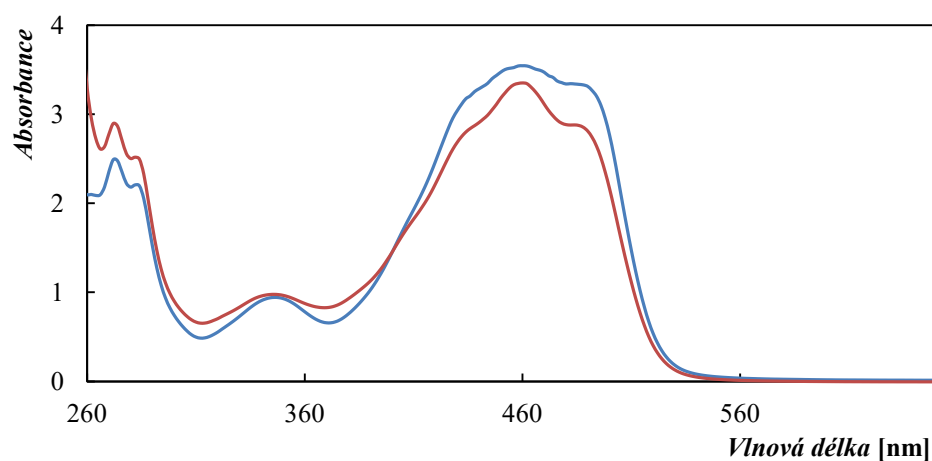
Následující obrázky 11, 12 a 13 zobrazují naměřená UV-VIS spektra jednotlivých vzorků rakytníkových olejů, které byly skladovány za různých teplotních podmínek. Modrá křivka znázorňuje oleje uchovávané v chladu a temnu, zatímco červená křivka oleje uchovávané za světla, při laboratorní teplotě.



Obrázek 11 Naměřené UV-VIS spektrum oleje 1 uchovávaného v **chlady** a za **laboratorní teploty** (optická délka kyvety 0,1 mm)



Obrázek 12 Naměřené UV-VIS spektrum oleje 2 uchovávaného v **chlady** a za **laboratorní teploty** (optická délka kyvety 2 mm)



Obrázek 13 Naměřené UV-VIS spektrum oleje 3 uchovávaného v **chlady** a za **laboratorní teploty** (optická délka kyvety 0,1 mm)

Skladováním vzorků při laboratorní teplotě, za světla, dochází ke snižování absorpance (obrázek 11 a 13). Výjimkou zůstává olej 2, u kterého nebyly pozorovány téměř žádné nebo naprosto minimální změny. Toto zjištění koresponduje i s dříve naměřenými hodnotami peroxidových čísel, které se po celou dobu dvou měsíců u zmíněného vzorku takřka neměnily. U olejů 1 a 3 byly naměřeny markantnější rozdíly v hodnotách peroxidových čísel, což se projevilo i v barevnosti olejů.

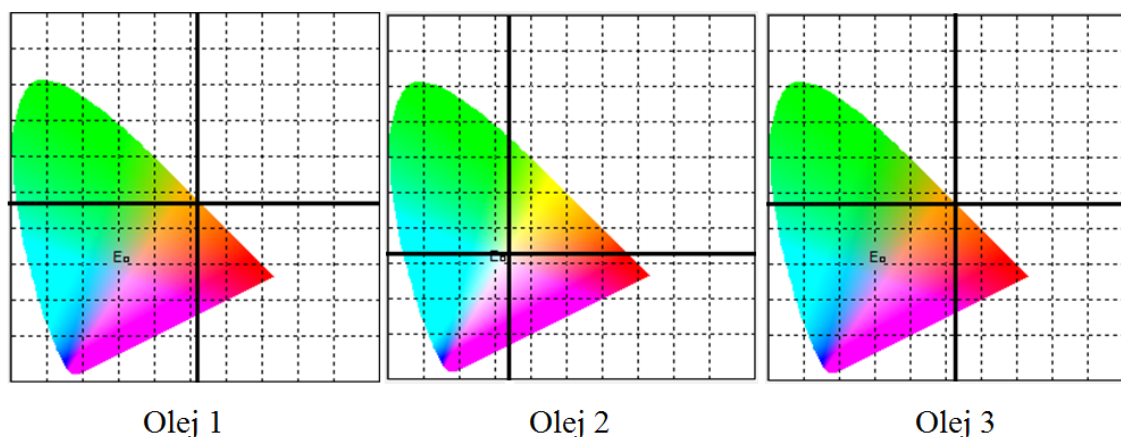
U vzorků olejů byly zjištěny hodnoty kolorimetrických parametrů $L^* a^* b^*$, pomocí metody CIE LAB popsané v kapitole 2.5.7. Zjištěné kolorimetrické parametry $L^* a^* b^*$ jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10 Naměřené hodnoty kolorimetrických souřadnic $L^* a^* b^*$ vzorků jednotlivých rakytníkových olejů pomocí programu WinASPECT® PLUS

Vzorek	Hodnota L^*	Hodnota a^*	Hodnota b^* ,
1.	88,2	13,3	136,7
2.	98,7	0,4	9,2
3.	85,9	16,7	138,6

Z tabulky vyplývá, že všechny oleje dosahují kladných hodnot souřadnic a^* i b^* . To znamená, že výsledná barva olejů je výsledkem mixu červené barvy (odpovídá kladným hodnotám souřadnice a^*) se žlutou (odpovídá kladným hodnotám souřadnice b^*). S přihlédnutím k oběma souřadnicím bude konečný odstín žlutý až žlutooranžový. U vzorku rakytníkového oleje č. 2 byla zjištěna nízká hodnota a^* , která vypovídá o minoritním zastoupení červené barvy, což odpovídá i subjektivnímu posouzení, kdy jedině olej 2 byl na rozdíl od oleje 1 a 3 zbarven spíše do světle žluta. Tomuto zjištění odpovídá i vyšší hodnota souřadnice L^* , která určuje, jak je daný materiál světlý či tmavý. Olej 2 se hodnotou parametru L^* blíží bezbarvé látce. Tato skutečnost dále potvrzuje subjektivní názor o rozdílnosti zbarvení oleje 2.

Na níže uvedeném obrázku 14 jsou zobrazeny barevné souřadnice rakytníkových olejů získané v programu WinASPECT® PLUS. Měření bylo provedeno v kyvetě o optické délce 0,1 mm.



Obrázek 14 Změřená spektra barevnosti jednotlivých rakytníkových olejů programem WinASPECT® PLUS

Z výše uvedených spekter na obrázku 14 můžeme jasně vidět odlišnost zabarvení jednotlivých olejů, kdy olej 1 a 3 odpovídají barvě složené ze sytějších odstínů červené a žluté barvy. V průsečíku os u oleje 2 můžeme vidět, že se jedná o olej světlé barvy, jež je téměř čirý.

5.3 Celkové shrnutí jednotlivých vzorků a kvalitativní závěry

Bylo zjištěno, že olej 2, se téměř ve všech parametrech odlišuje od olejů 1 a 3 a to následovně:

- Peroxidové číslo má mnohem nižší (při otevření 3 - 4x) než další dva zkoumané oleje a toto číslo se jen velmi málo mění při skladování za laboratorních podmínek i v chladu. Výsledkem po 2 měsících od otevření, je to, že peroxidové číslo vzorku 2 je 8x respektive 12x větší než peroxidové číslo vzorků 1 respektive 3.
- Jodové číslo vzorku 2 je o něco nižší, než je tomu u druhých olejů, tento rozdíl však není tak výrazný.
- Oproti vzorkům 1 a 3 má olej značky Relikt – Art Engel nižší hodnotu čísla zmydlnění (~161 mg_{KOH}/g oproti ~190 mg_{KOH}/g)
- Další výrazný rozdíl mezi vzorky je v barevnosti, respektive v optické hustotě vzorků, kde vzorek č. 2 je méně barevný (což dokazují i kolorimetrické parametry) a to ve srovnání s oleji 1 a 3 téměř průhledný
- Rozdíly v čísle kyselosti jsou jen malé (rozdíly v esterovém čísle jsou dány pouze rozdíly v čísle zmydlnění)

6 ZÁVĚR

Tato práce se zabývá charakterizací rakytníkového oleje. K tomuto účelu byly použity tři vzorky komerčně dostupných rakytníkových olejů různých obchodních značek. K obecné charakterizaci olejů slouží stanovení takzvaných tukových čísel. V této diplomové práci byla věnována pozornost stanovení peroxidových čísel, jodových čísel, čísel zmýdelnění a čísel kyselosti, které se stanovují titračně. Pro objektivnější stanovení charakteristik olejů a tuků se využívá metod chromatografických, jako jsou HPLC a GC. Výrazná část diplomové práce se zabývala měřením peroxidového čísla a vlivu vnějších podmínek na kvalitu a stabilitu rakytníkových olejů. Rakytníkový olej se vyznačuje vysokým množstvím polyenových mastných kyselin a je tudíž možné předpokládat jeho vyšší náchylnost k oxidaci. U oleje 1 a 3 dochází k výraznému zvýšení peroxidového čísla s probíhajícím časem zejména u olejů skladovaných za laboratorních podmínek. U vzorku 1 po dvou měsících od otevření byla tato hodnota v chladu 30,15 mekv/kg a za laboratorních podmínek 48,78 mekv/kg. Vzorek 3 vykazoval největší zaznamenané změny peroxidového čísla ze všech vzorků, kdy za laboratorních podmínek dosáhla hodnota peroxidového čísla až 83,27 mekv/kg po dvou měsících od otevření. Naproti tomu olej 2 vykazoval nepatrné změny v hodnotách peroxidových čísel nezávisle na skladování.

Dále byly změřeny hodnoty jodových čísel. K tomuto stanovení byla použita metoda podle Hanuše, kdy je ke stanovení použit jódmonobromidový roztok. U naměřených hodnot jodových čísel a čísel kyselosti nebyl pozorován tak výrazný rozdíl mezi jednotlivými oleji, jako u čísel peroxidových. Významnější rozdíl vykazují hodnoty čísla zmýdelnění, které se u vzorku 2 pohybují okolo 160 mg_{KOH}/g, zatímco oleje 1 a 3 mají tyto hodnoty srovnatelné a to okolo 190 mg_{KOH}/g. Menší hodnota naznačuje nižší obsah celkových mastných kyselin u oleje 2. Odlišné vlastnosti oleje 2 byly potvrzeny i stanovením kolorimetrických parametrů.

Zatímco srovnání peroxidových čísel by mohlo ukazovat na vyšší stabilitu oleje č. 2, ostatní rozdíly spíše podporují představu o variabilitě celkového složení jednotlivých vzorků. Jak ukazují data z literatury^[44] nebo předchozích experimentů^[2] je u komerčních preparátů rakytníkových olejů vysoká pravděpodobnost nastavování originálního oleje pomocí jiných rostlinných olejů (např. slunečnicovým). Z důvodu odlišností oleje 2 téměř ve všech charakteristikách je možné usuzovat, že bylo jeho složení pravděpodobně výrobcem upraveno za účelem vyššího výdělku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Blecha, J., Rakytník řešetlákový (*Hippophae rhamnoides* L.) jako zdroj biochemicky aktivních látek, Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, 2012
- [2] MICHALÍKOVÁ, A, Flavonoidy a další biologicky aktivní látky v rakytníku, Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, 2014
- [3] CONSTANDACHE, C., et al. The usage of Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L.) for improving Romania's degraded lands. *AgroLife Scientific Journal*, 2016, 5.2: 50-58.
- [4] Suryakumar, G., Gupta, A.: Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.), *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 138, 268-278
- [5] HEGNAUER R., Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. 4, Dicotyledoneae: Daphniphyllaceae – Lythraceae, str. 54-59. Birkhauser verlag basel, 1966
- [6] BAJER, J., *Rakytník: zázračná rostlina, oranžový poklad*, Praha: Mladá fronta, 2014. ISBN 978-80-204-3385-5.
- [7] Yang, B., Kallio, H., Effects of harvesting time on triacylglycerols and glycerophospholipids of Sea Buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different origins, *J Food Compos Anal*, 2002, 15, 143–157
- [8] KAPOOR, D. N., A review on pharmacognostic, phytochemical and pharmacological data of various species of *Hippophae* (Sea buckthorn). *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 2017, 11.01.
- [9] Health Benefits of Sea Buckthorn [Online], Dostupné z: <http://www.seabuckthorninsider.com/news/health-benefits-of-sea-buckthorn/>, staženo dne 17.5.2017
- [10] VALÍČEK, P, L. KOKOŠKA a K. HOLUBOVÁ., *Léčivé rostliny třetího tisíciletí*. Benešov: Start, 2001. ISBN 80-86231-14-3.

- [11] LI, Thomas SC; MCLOUGHLIN, Colin. Sea buckthorn production guide. Canada Seabuckthorn Enterprises Limited, 1997.
- [12] VALÍČEK, P. a E. V. HAVELKA. Rakytník řešetlákový: rostlina budoucnosti. Benešov: Start, 2008. ISBN 978-80-86231-44-0.
- [13] LI, T. S. C. a T. H. J. BEVERIDGE. *Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.): production and utilization*. Ottawa: NRC Research Press, 2003. ISBN 0660190079.
- [14] WOJDYŁO, A.; OSZMIĄŃSKI, J.; CZEMERYŚ, R., Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food chemistry*, 2007, 105.3: 940-949.
- [15] PUUPPONEN-PIMIÄ, R., et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology*, 2001, 90.4: 494-507.
- [16] RAFFO, A.; PAOLETTI, F.; ANTONELLI, M., Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) cultivars. *European Food Research and Technology*, 2004, 219.4: 360-368.
- [17] SLANINA, J.; TABORSKÁ, E., Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické listy*, 2004, 98.5: 239-245.
- [18] MANACH, C., et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 2004, 79.5: 727-747.
- [19] HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 2002, 96.2: 67-202.
- [20] Program pro vytváření struktur organických sloučenin [Online], dostupné z: <http://www.chemspider.com/StructureSearch.aspx>, staženo 13. 5. 2017
- [21] Raffo, A., Paoletti, F., Antonelli, M., Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) cultivars, *European Food Research and Technology*, 2004, 219, 360-368

- [22] YUZHEN, Z.; FUHENG, W.. Seabuckthorn flavonoids and their medical value. *Hippophae*, 1997, 10: 39-41.
- [23] PADAYATTY, S. J., et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American college of Nutrition*, 2003, 22.1: 18-35.
- [24] Bal, L., Meda, V., Naik, S. N., Satya, S., Sea buckthorn berries: A potential source of valuable nutrients for nutraceuticals and cosmoceuticals, *Food Research International*, 2011, 44, 1718-1727
- [25] YANG, B., Sugars, acids, ethyl β -D-glucopyranose and a methyl inositol in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries. *Food Chemistry*, 2009, 112.1: 89-97.
- [26] RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 2007, 55.3: 207-216.
- [27] SCHWARTZ, H., et al., Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, 21.2: 152-161.
- [28] YANG, B., et al. Effects of dietary supplementation with sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) seed and pulp oils on atopic dermatitis. *The Journal of nutritional biochemistry*, 1999, 10.11: 622-630.
- [29] ABID, H.; HUSSAIN, A.; ALI, S. Physicochemical characteristics and fatty acid composition of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L) oil. *Jour. Chem. Soc. Pak*, 2007, 29: 256-259.
- [30] KREJCAROVÁ, J., et al., Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) as a potential source of nutraceuticals and its therapeutic possibilities-a review. *Acta Veterinaria Brno*, 2015, 84.3: 257-268.
- [31] LARMO, P. S., et al., Effects of sea buckthorn oil intake on vaginal atrophy in postmenopausal women: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Maturitas*, 2014, 79.3: 316-321.

- [32] MISHRA, K. P., et al. Effect of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) flavone on immune system: an in-vitro approach. *Phytotherapy Research*, 2008, 22.11: 1490-1495.
- [33] JÍLEK, P., *Základy imunologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Anyway, 2008. ISBN 978-80-254-2422-3.
- [34] ZEB, A., Anticarcinogenic potential of lipids from *Hippophae*; Evidence from the recent literature. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2006, 7.1: 32.
- [35] ENKHTAIVAN, G., et al., Extreme effects of Seabuckthorn extracts on influenza viruses and human cancer cells and correlation between flavonol glycosides and biological activities of extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2016.
- [36] VASHISHTHA, V., et al. Effect of seabuckthorn seed oil in reducing cardiovascular risk factors: A longitudinal controlled trial on hypertensive subjects. *Clinical Nutrition*, 2016.
- [37] YANG, B., et al. Composition and antioxidative activities of supercritical CO₂-extracted oils from seeds and soft parts of northern berries. *Food Research International*, 2011, 44.7: 2009-2017.
- [38] YANG, B.; KALLIO, H. Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophae*) lipids. *Trends in Food Science & Technology*, 2002, 13.5: 160-167.
- [39] KOOLMAN, J. a K.-H. RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [40] SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2002, 56.8: 365-379.
- [41] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin 1*, OSSIS, Tábor, 1999, ISBN 80-902391-3-7.
- [42] VELASCO, J.; DOBARGANES, Carmen. Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2002, 104.9-10: 661-676.

- [43] KORTESNIEMI, M., et al. NMR metabolomics demonstrates phenotypic plasticity of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries with respect to growth conditions in Finland and Canada. *Food Chemistry*, 2017, 219: 139-147.
- [44] HURKOVA, K., et al. Strategies to Document Adulteration of Food Supplement Based on Sea Buckthorn Oil: a Case Study. *Food Analytical Methods*, 2016, 1-11.
- [45] České technické normy [Online], dostupné na: <https://csnonline.unmz.cz/>, staženo dne 16. 3. 2017
- [46] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR, Český lékopis 2009 – Doplněk 2013. Praha: Grada Publishing, 2013. ISBN 978-80-247-4679-1.
- [47] Lipidy [Online], dostupné z: <https://web.vscht.cz/~koplikr/Lipidy2.pdf>, staženo dne 22. 4. 2017
- [48] DAVÍDEK, J. aj. VELÍŠEK. *Analýza potravin*. Praha: VŠCHT, 1988
- [49] Hálková, J., Rumíšková, M., Riedlová, J.: *Analýza potravin*. 2. vydání. Újezd u Brna: Vydavatel RNDr. Ivan Straka, 2001. 101 s. ISBN 80-86494-02-0
- [50] GANONG, W. F., *Přehled lékařské fyziologie: dvacáté vydání*. Praha: Galén, c2005. ISBN 80-7262-311-7.
- [51] COMMISSION INTERNATIONAL DE L'ECLAIRAGE. Technical report, Colorimetry, CIE Central Bureau, Vienna, 2004
- [52] PANÁK, O. Měření barevnosti. Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice
- [53] HABEL J., Základy světelné techniky (5), Časopis Světlo, 06/2009
- [54] CIE-LAB colour models, Technical guides, [Online], dostupné na: http://dba.med.sc.edu/price/irf/Adobe_tg/models/cielab.html, staženo 16. 5. 2017
- [55] VINKLEROVÁ, K. Netradiční oleje s antimikrobními účinky, Diplomová práce, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2015

- [56] Základní praktikum z analytické chemie, Návod k praktickým úlohám, Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, 2004, verze 10.02.2017
- [57] KYZLING, V. Teoretické základy konzervace potravin, SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha 1988, str. 49 - 51
- [58] LOKANATHAÁRAI, K. M., et al. Determination of iodine number of oils using Chloramine-T as reagent. *Analyst*, 1995, 120.11: 2769-2770.
- [59] HILP, M.. Determination of iodine values according to Hanuš using 1, 3-dibromo-5, 5-dimethylhydantoin (DBH): Analytical methods of pharmacopeias with DBH: part 7. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2002, 28.1: 81-86.
- [60] ABID, H. Physicochemical characteristics and fatty acid composition of Sea-buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) oil. 2007. *Journal of the Chemical Society of Pakistan. roč. 29. č. 3.*
- [61] KAUSHAL, M.; SHARMA, P. C. Nutritional and antimicrobial property of seabuckthorn (*Hippophae* sp.) seed oil., *Journal of Scientific & Industrial Research*, 2011
- [62] Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti [Online], dostupné na: https://web.vscht.cz/~koplikr/UV_VIS_spektrometrie.pdf, staženo 8. 5. 2017